Université de Sherbrooke

La MAP kinase p38γ influence la structure des cardiomyocytes

Par

Philippe Plamondon

Département de Pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Mai 2014

Membres du jury d'évaluation
Pr. Mannix Auger-Messier, Ph. D. Pharmacologie
Pr. Michel Grandbois, Ph. D. Pharmacologie
Pr. Guylain Boissonneault, Ph. D. Biochimie

© Philippe Plamondon 2014

RÉSUMÉ

La MAP kinase p38γ influence la structure des cardiomyocytes

Par

Philippe Plamondon

Département de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Le cœur est un organe central au fonctionnement du système cardiovasculaire. Il est physiologiquement compartimenté et est constitué de cellules spécialisées qui régulent les impulsions électriques ainsi que la contraction du myocarde. Le cœur adapte le flux sanguin en fonction des besoins du corps. En condition pathologique, le cœur recourt toutefois à des mécanismes compensatoires. Au niveau physiologique, la compensation s'observe par l'hypertrophie des cardiomyocytes qui, bien que bénéfique à court terme, exacerbe à long terme la fonction cardiaque. L'activation des « mitogen-activated protein kinases » (MAPK) contribue autant au maintien de la fonction physiologique qu'à la détérioration pathologique du myocarde et serait également une cause de l'hypertrophie observée. Parmi les 5 groupes de MAPK connues, la MAPK p38 est formée de 4 isoformes dont les sérine/thréonine kinases p38α et p38γ sont exprimées de façon prédominante dans le cœur. Les p38 partagent les mêmes activateurs, mais leurs effecteurs diffèrent. Bien que le rôle de p38α semble impliqué dans l'aggravement des troubles cardiaques, celui de p38γ ne semble pas redondant à p38α et demeure incompris. Cette isoforme possède un motif de liaison aux domaines PDZ, unique chez les MAP kinases. Également, chez les cellules cardiaques, elle transloque au noyau en condition de stress. Le but de l'étude ici est de comprendre le rôle de p38γ et de ses motifs uniques sur la structure et la taille des cardiomyocytes. Afin de répondre au but de l'étude, plusieurs mutants adénoviraux de p38 ont été conçus. Un des mutants ne possède pas le motif de liaison aux domaines PDZ, deux autres contrôlent la localisation cellulaire soit au noyau, soit au cytoplasme, et un autre mutant est muté au site de phosphorylation. Des cardiomyocytes en culture ont été infectés par les différents mutants en présence de leur activateur en amont ou de la β-galactosidase. Les réseaux d'α-actinine, ainsi que la taille des cardiomyocytes, ont été observés par microscopie. Les observations effectuées montrent que p38γ entraîne une désorganisation des réseaux d'α-actinine lorsqu'il est phosphorylé. Également, il facilite l'hypertrophie des cardiomyocytes en présence de son activateur s'il est forcé hors du noyau ou en l'absence de son motif de liaison aux domaines PDZ. En conclusion, les résultats obtenus suggèrent que p38γ exerce bel et bien un rôle dans le maintien structural des cardiomyocytes par l'intermédiaire de l'α-actinine.

Mots clés : MAP kinase, p38, cardiomyocyte, localisation, domaine PDZ

Sans technique, un don n’est rien qu’une sale manie.

Georges Brassens

Table des matières

Résumé iii
Table des matières v
Liste des figures vii
Liste des tableaux viii
Liste des abréviations ix
Introduction 10
1.1 Le système cardiovasculaire 10
1.1.1 Physiologie et structure du coeur 10
1.2 Les composantes cellulaires du cœur 11
1.2.1 Cardiomyocytes 12
1.2.2 Les cellules pacemaker 12
1.2.3 Les fibres de Purkinje 14
1.3 La contraction du muscle cardiaque 14
1.4 Demande énergétique 16
1.5 Le cœur en condition de stress physiopathologique 16
1.6 Voie des *Mitogen Activated Protein Kinase* 18
1.6.1 MAPK 19
1.6.1.1 P38 20
1.7 Objectifs de l'étude 21
Matériel et méthodes 22
2.1 Matériel 22
2.2 Méthodes 23
2.2.1 Constructions plasmidiques 23
2.2.2 Mutagénèse dirigée 23
2.2.3 Recombinaisons adénovirales 24
2.2.3.1 Sous-clonage des constructions dans le vecteur pENTR 3C Dual Selection 24
2.2.3.2 Recombinaison *in vitro* dans le vecteur pAD/CMV/V5-DEST 25
2.2.3.3 Amplification adénovirale 25
2.2.4 Expérimentations sur cellules en culture 26
2.2.4.1 Culture cellulaire 26
2.2.4.2 Transfection 26
2.2.4.3 Infection adénovirale 26
2.2.4.4 Gel polyacrylamide et immunobuvardage 26
2.2.4.5 Microscopie Confocale 27

2.2.5 Mesure de la taille cellulaire 28
2.2.6 Phosphorylation de p38γ 28
2.2.7 Fractionnement du sarcoplasme et du noyau 29
Résultats 30
3.1 Constructions plasmidiques 30
3.2 Constructions adénovirales 32
3.3 Expression et localisation cellulaire des constructions adénovirales 34
3.4 Phosphorylation de p38γ 37
3.5 Effets de p38γ sur le réseau d'α-actinine des cardiomyocytes 39
3.6 Taille cellulaire des cardiomyocytes 43
Discussion 46
4.1 Construction et activation des mutants adénoviraux 46
4.2 Altération des réseaux d'α-actinine 49
4.3 Altération de taille cellulaire 50
Conclusions et perspectives 53
Remerciements 55
Liste des références 56

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation de la structure du cœur 11

Figure 2: Représentation de la structure du muscle cardiaque 13

Figure 3: Organisation des sarcomères d'un cardiomyocyte en culture 15

Figure 4 : Équation de Poiseuille 16

Figure 5: Voie de signalisation des MAPK 18

Figure 6 : Représentation schématique des constructions de p38 30

Figure 7 : Criblage de clones du gène p38γ inséré dans p3xFLAG CMV 7.1 31

Figure 8 : Représentation schématique des mutants p38 32

Figure 9 : Criblage de clones du gène p38γ dans pENTR 3C Dual Selection 33

Figure 10 : Criblage des recombinaisons homologues pAD/CMV/V5-DEST 34

Figure 11 : Expression des adénovirus des mutants de p38 35

Figure 12 : Localisation cellulaire des infections adénovirales de p38 36

Figure 13 : Phosphorylation de la kinase p38γ détectée par gel de type PhosTag 37

Figure 14 : Phosphorylation et localisation cellulaire des mutants de p38γ 38

Figure 15 : Réseaux d'α-actinine des RNVC en présence des mutants p38 42

Figure 16: Micrographie d'un cardiomyocyte infecté par un mutant p38 44

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Constructions plasmidiques vers p3xFLAG CMV 7.1 24
Tableau 2 : Constructions plasmidiques vers pENTR 3C Dual Selection 25
Tableau 3 : Taille cellulaire en fonction des infections en présence de sérum 45
Tableau 4 : Taille cellulaire en fonction des infections en absence de sérum 45

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ANP	Atrial natriuretic peptide
BNP	B-type natriuretic peptide
BSA	Bovine Serum Albumin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Domaine CD	Common Docking Domain
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
hDlg	human Disk Large Homolog
IPKA	Inhibiteur de Protéine Kinase alpha cAMP-dépendant
JNK	C-Jun N-Terminal Kinase
KETXL	Séquence d'acides amines en C-terminal qui lie les domaines PDZ
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MKK6ca	MKK6 Constitutivement Actif
MKKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase
Nav	Canal sodique dépendant du voltage
NES	Nuclear Export Site
NLS	Nuclear Localization Signal
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDZ	**P**ost synaptic density protein, **D**rosophila disc large tumor suppressor, **Z**onula occludens-1 protein
PNK	Polynucleotide Kinase
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RNVC	Rat Neonate Ventricular Cardiomyocytes
RS	Réticulum Sarcoplasmique
TBS	Tris Buffer Saline

Introduction

Les troubles cardiovasculaires et les maladies cardiaques représentent un fléau important au Canada et dans le monde. À l'échelle canadienne, 29% des décès sont attribuables aux maladies cardiovasculaires, et plus de la moitié de celles-ci sont imputables aux troubles ischémiques cardiaques (FMC, 2013). Les maladies du cœur représentent une dépense importante pour la société en termes de coûts et d'hospitalisations, soient plus de 20 milliards de dollars et près de 3 millions d'hospitalisations annuelles, respectivement (FMC, 2013). Cette situation fait des maladies cardiaques une cible de traitement pouvant bénéficier à un nombre plus qu'important de la population. Les mécanismes sous-jacents à ces maladies méritent donc d'être davantage compris pour l'élaboration de traitements novateurs et appropriés.

1.1 Le système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire du corps a pour fonction d'acheminer, par l'intermédiaire du sang, des nutriments, de l'oxygène, des hormones et des déchets métaboliques, aux organes appropriés. Ce système est assuré par les artères et les veines qui, à leur tour, se divisent en artérioles et veinules, puis en capillaires. Le flot sanguin nécessaire à la circulation de tous ces éléments est produit par un organe central : le cœur.

1.1.1 Physiologie et structure du coeur

Le cœur est un sac creux de la taille du poing. Sa structure la plus externe est le péricarde, un tissu qui forme le sac et qui englobe les autres structures présentes. Directement sous le péricarde se trouve le myocarde, qui est le muscle contractile du cœur. L'endocarde est une couche de cellules endothéliales de la paroi intérieure du cœur et qui enveloppe le myocarde. Les compartiments internes situés à gauche du cœur sont séparés de ceux situés à droite par le septum ventriculaire. Les ventricules droit et gauche sont séparés des oreillettes par des valves musculaires, la valve tricuspide et mitrale respectivement.

Le cœur est divisé en 4 compartiments qui permettent la circulation sanguine, l'oreillette gauche, l'oreillette droite, le ventricule gauche, et le ventricule droit (figure 1). Ces compartiments sont divisés par du tissu conjonctif (Katz, 2006). Les oreillettes sont les chambres réceptrices du sang. L'oreillette droite reçoit le sang en provenance de l'organisme par les veines caves supérieure et inférieure, tandis que l'oreillette gauche reçoit le sang fraîchement oxygéné des poumons. Les ventricules, quant à eux, s'emplissent du sang provenant des oreillettes. Le ventricule droit redirige le sang pauvre en oxygène vers les poumons, et le ventricule droit réachemine le sang oxygéné dans l'organisme par l'aorte.

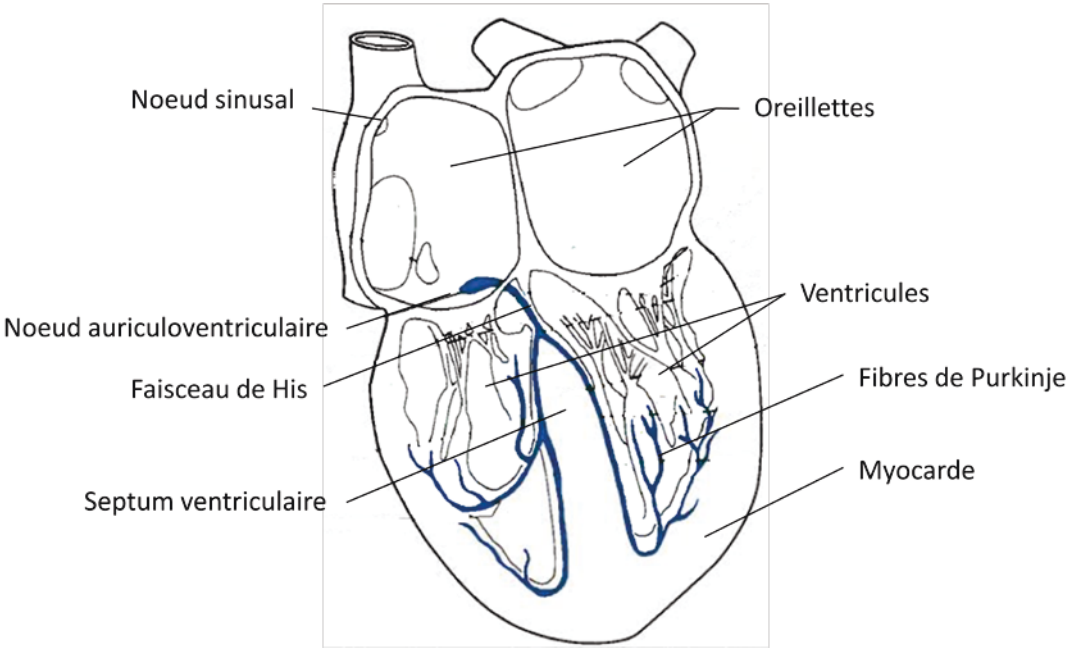


Figure 1 : **Représentation de la structure du cœur**
Le cœur est constitué d'une structure compartimentée. On y retrouve plusieurs types de cellules, dont des cellules nerveuses, des fibroblastes (non montré), et des cellules musculaires (tiré de Lilly, 2011).

1.2 Les composantes cellulaires du cœur

Afin d'accomplir son rôle, le cœur dispose de plusieurs cellules spécialisées. Comme tous les organes, il contient des cellules endothéliales permettant l'oxygénation adéquate du myocarde et des cellules conjonctives, tels les fibroblastes, assurant le maintien de sa structure. Cependant, la rythmicité et la contraction sont engendrées par des cellules spécialisées : les fibres de Purkinje et les cardiomyocytes.

1.2.1 Cardiomyocytes

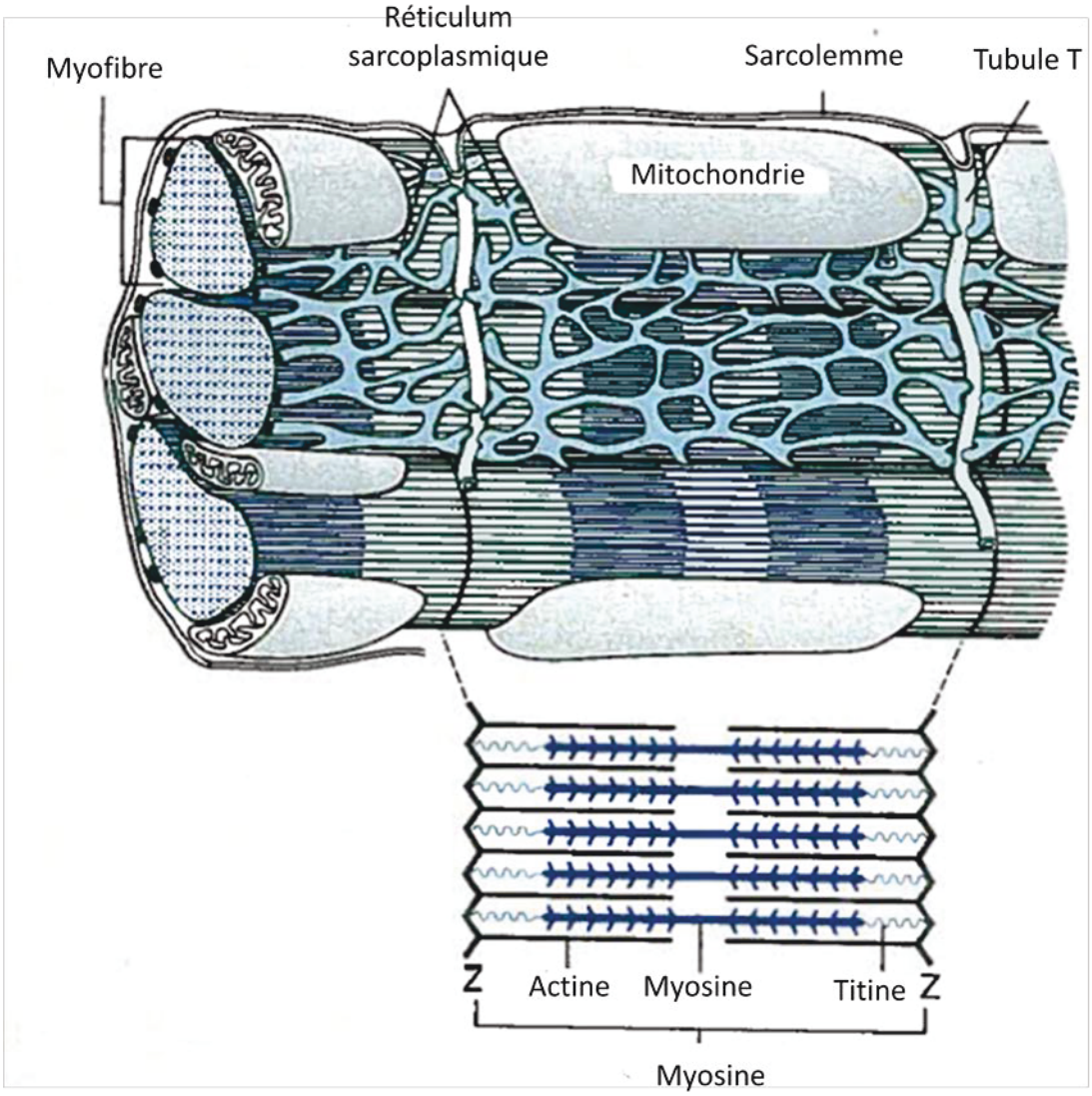
Les cardiomyocytes sont les cellules musculaires striées du cœur. D'une taille avoisinant les 100 μm de longueur et les 21 μm de largeur, leur abondance constitue environ 75% des ventricules (Longo, 2012). Les cardiomyocytes possèdent un agencement d'organites particulier qui leur permet d'accomplir leur rôle (figure 2). Contrairement aux cellules des muscles squelettiques qui sont multinucléées, les cardiomyocytes ne possèdent qu'un ou deux noyaux cellulaires (Lilly, 2011). Également, compte tenu du fort apport en ATP requis par le cœur, chaque myocyte contient de nombreuses mitochondries, qui constituent environ 35% du volume cellulaire. On retrouve le réticulum sarcoplasmique, un réseau tubulaire qui loge le calcium intracellulaire qui est en contact avec les tubules T. Chaque myocyte est enveloppé d'une membrane plasmique, le sarcolemme, et contient plusieurs myofibrilles (Lilly, 2011). Le sarcolemme est également parcouru de tubules T, qui servent à augmenter la surface de contact des cellules avec le milieu extracellulaire dans le but de faciliter les échanges d'ions, notamment le calcium.

Les myofibrilles renferment plusieurs sarcomères, qui forment la structure basale de la contractilité. Chaque sarcomère est défini et se distingue des sarcomères voisins par deux lignes Z, qu'il partage avec les sarcomères adjacents. Ils sont disposés selon un axe à l'intérieur de la cellule, et cet axe est dépendant de la morphologie du cardiomyocyte (figure 3). Sur les lignes Z se retrouvent les disques intercalaires. Ces structures caractéristiques du muscle cardiaque font office de jonction communicante entre les cardiomyocytes et assurent la continuité électrique du tissu (Lilly, 2011). On retrouve également l'α-actinine sur les lignes Z. Cette protéine régule la distance entre deux filaments d'actine en y étant liée. Les filaments d'actine et de myosine se situent entre deux lignes Z et sont responsables de la contraction du sarcomère (figure 2)

1.2.2 Les cellules pacemaker

Les cellules dites pacemaker sont des cellules musculaires cardiaques spécialisées situées dans le nœud sinusal qui se dépolarisent de manière spontanée. Elles initient les battements cardiaques, et leur fréquence est régulée par plusieurs éléments. Le système

nerveux autonome parasympathique a pour rôle de ralentir la fréquence du nœud ainsi que la conduction électrique. Le système sympathique, conjointement avec la demande en oxygène du myocarde, augmente la fréquence du nœud (Guénard, 2009). Les courants ioniques qui régulent les cellules pacemaker sont multiples et impliquent des variations intracellulaires de sodium, de potassium et de calcium (Irisawa, Brown, & Giles, 1993).



<u>Figure 2</u>: Représentation de la structure du muscle cardiaque

Le muscle est composé de regroupements de myosine en myofibres. Leur contraction est induite par l'entrée de calcium au niveau des tubules T, situés entre les myofibres, qui permettent la relâche calcique du réticulum sarcoplasmique (adapté de Lilly, 2011)

1.2.3 Les fibres de Purkinje

Les fibres de Purkinje sont des cellules qui génèrent la contraction du myocarde. Elles débutent au noeud auriculoventriculaire et longent le septum ventriculaire avant de se réorienter de part et d'autre des ventricules. Le potentiel électrique au repos environne - 90 mV (Guénard, 2009), et l'amplitude après activation peut atteindre 120 mV (Katz, 2006). Elles se distinguent des cellules pacemaker par leur capacité de conduction rapide.

Tout comme le nœud sinusal, les fibres de Purkinje peuvent générer des potentiels d'action de manière autonome. Leur fréquence est cependant plus faible et environne de 25 à 40 impulsions à la minute (Katz, 2006). De ce fait, leur dépolarisation est orchestrée par le nœud sinusal, qui produit des potentiels d'action à une plus grande fréquence (Boyden, Hirose, & Dun, 2010).

1.3 La contraction du muscle cardiaque

Tandis que les muscles squelettiques définissent leur contraction par une excitation nerveuse et par une variation de longueur et de tension, le muscle cardiaque traduit sa contraction par une auto-activation et par une variation de pression et de volume du cœur (Katz, 2006). Cette contraction engendre deux pressions successives : la systole et la diastole.

Les protéines fonctionnelles du sarcomère sont les unités qui interagissent ensemble pour effectuer la contraction (figure 2). L'une d'entre elles est l'isoforme α cardiaque de l'actine, bien que l'actine α squelettique s'y retrouve en plus faible proportion (Katz, 2006). Cette protéine en double hélice se retrouve liée perpendiculairement aux lignes Z. L'α-actinine 1 est une protéine du cytosquelette sarcomérique retrouvée au long de la ligne Z qui régule la distance séparant deux filaments d'actine en liant cette dernière (Gautel, 2011). Étant donné que l'α-actinine se retrouve à la ligne Z, elle peut être employée pour délimiter les sarcomères d'un cardiomyocyte (figure 3). La tropomyosine et la troponine, quant à elles, se retrouvent intercalées dans les filaments

d'actine. La première régule l'interaction entre l'actine et la myosine, tandis que la deuxième régit les activités ATPase et la liaison du calcium nécessaires à la régulation de la contraction musculaire. La myosine est une protéine située entre les filaments d'actine retenue par la titine aux lignes Z. Le rôle de cette protéine est de diminuer la distance séparant deux filaments d'actine sur un même plan, se traduisant par un rétrécissement du sarcomère, donc par une contraction. Ce rôle est achevé par la liaison des têtes de myosine qui lient de manière successive les troponines tout au long de l'actine.

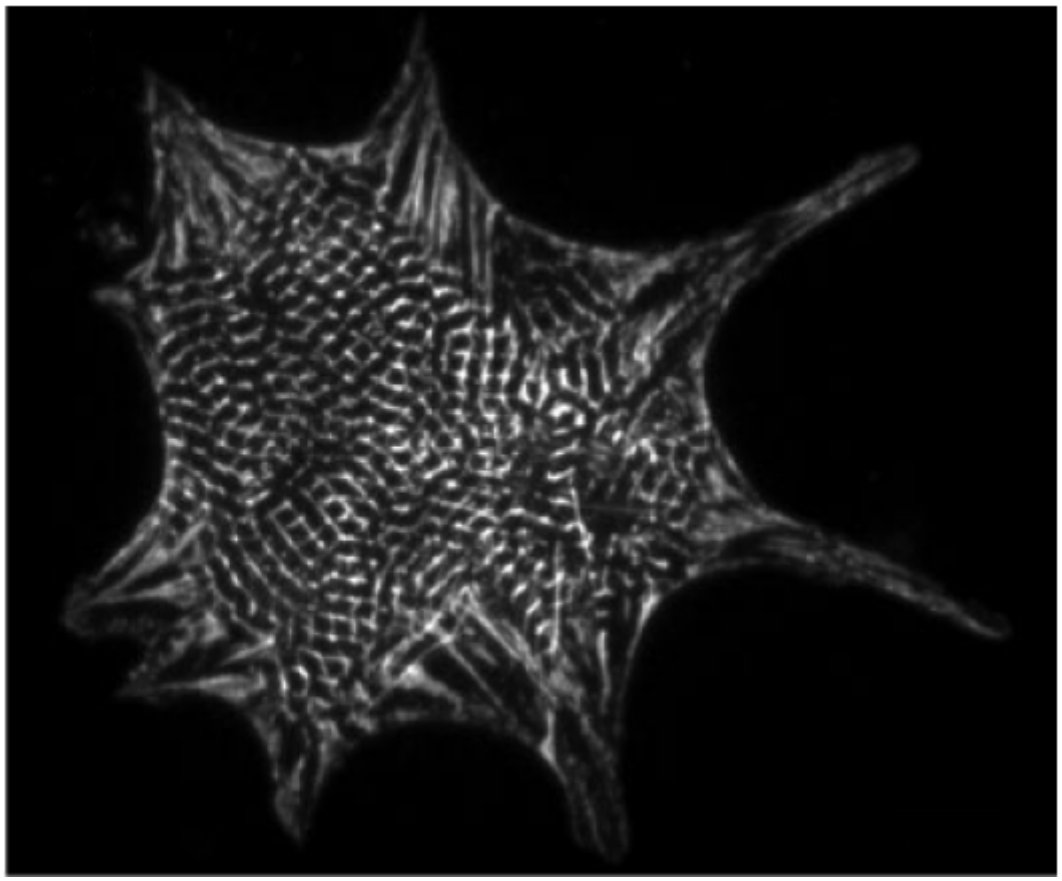


Figure 3 : Organisation des sarcomères d'un cardiomyocyte en culture

Cette micrographie d'un cardiomyocyte en culture montre un réseau de sarcomères. Les bandes intérieures représentent l'α-actinine aux lignes Z. L'agencement des sarcomères est dépendant de la forme du cardiomyocyte, qui peut varier selon son microenvironnement (Bray, Sheehy, & Parker, 2008).

1.4 Demande énergétique

Le cœur est un organe qui effectue d'énormes dépenses énergétiques en continu. Au repos, il consomme 5% de l'O_2 total de l'organisme (Guénard, 2009), et l'entièreté de l'oxygène du sang circulant dans ses artères coronaires (Haddad & Lister, 1996). Dans le cadre de ses fonctions normales, il tire l'essentiel de ses besoins énergétiques pour la contraction des cardiomyocytes dans l'oxydation des lipides. Cette oxydation est une réaction aérobie qui est alimentée selon les besoins par le flot sanguin circulant dans l'artère coronaire (Lilly, 2011).

Le flot sanguin est très important pour l'apport régulé de nutriments et d'oxygène au cœur. Le flot est intimement lié à la pression de perfusion et à la résistance vasculaire (Lilly, 2011). La relation qui décrit cette relation est représentée par l'équation de Poiseuille à la figure 4, où F est le flux sanguin, P la variation de pression d'un point à un autre, r le rayon du vaisseau sanguin, η la viscosité sanguine et L la longueur du vaisseau sanguin (Klabunde, 2011). Étant donné que l'oxygène prélevé du sang est à son maximum, une augmentation des besoins en oxygène doit se traduire par une augmentation du débit sanguin. Conséquemment, il est essentiel que cette alimentation se fasse en continu et qu'elle soit régulée selon les variations exigées par un effort physique ou toute perturbation à l'équation de Poiseuille, car les cellules cardiaques ne sont pas en mesure de subvenir à leurs besoins en milieu carencé.

$$F = \frac{\Delta P \cdot r^4}{\eta \cdot L}$$

Figure 4 : Équation de Poiseuille

1.5 Le cœur en condition de stress physiopathologique

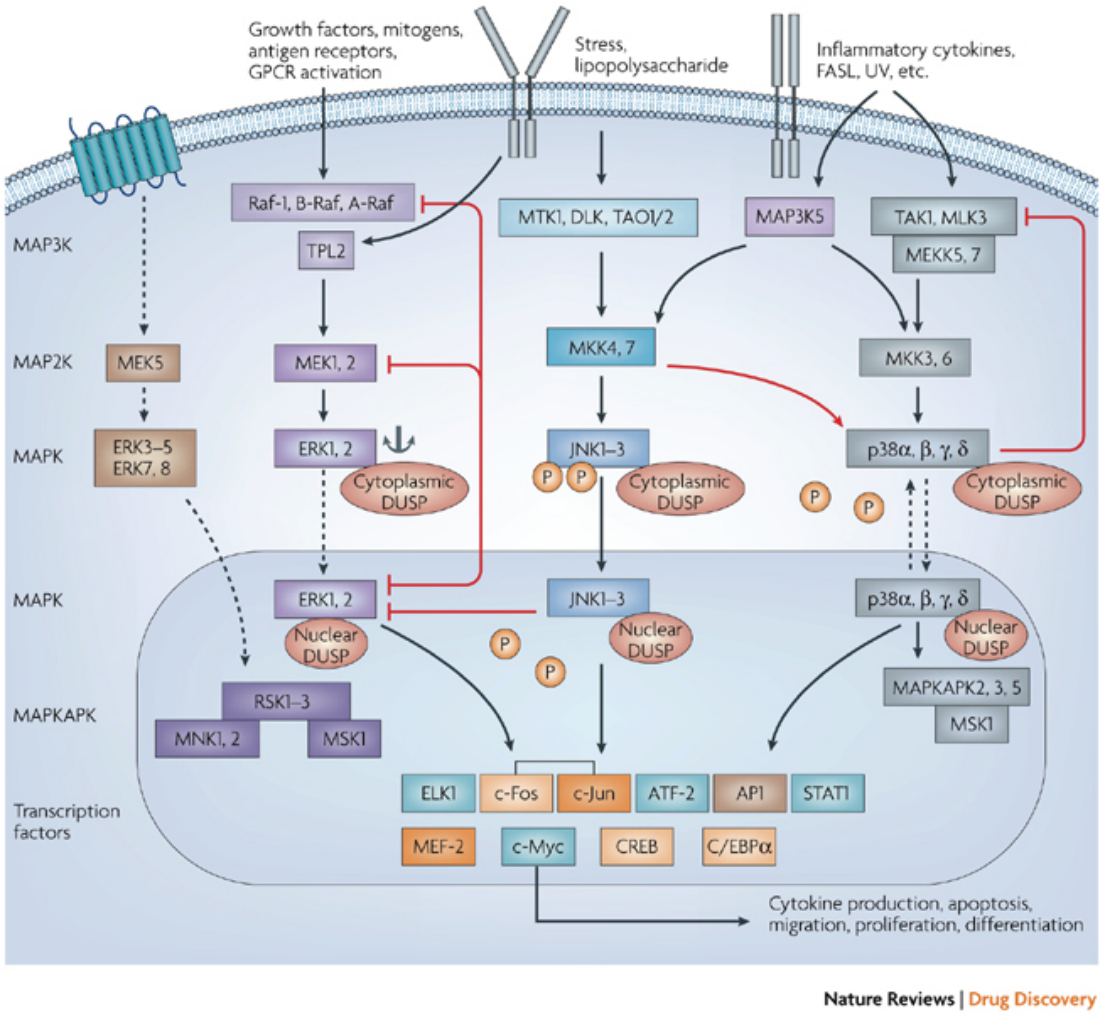
Le système cardiovasculaire humain peut être altéré selon une multitude de facteurs. Certaines conditions, comme l'athérosclérose ou l'augmentation de la rigidité des vaisseaux sanguins entre autres, ont pour effet de moduler le flux sanguin tel que décrit

à la figure 4. Les déchets métaboliques s'accumulent, et la demande en oxygène excède alors la disponibilité. Le cœur entre dans un état ischémique qui peut mener à de l'insuffisance cardiaque. Dans cet état d'ischémie, le cœur se met à exprimer à nouveau des gènes fœtaux (Maisel & Choudhary, 2012). Également, le cœur recourt à trois mécanismes physiologiques compensatoires (Haddad & Lister, 1996). Le premier est le mécanisme de Frank-Starling, qui stipule que la force de contraction cardiaque est corrélée au volume sanguin reçu. Lorsque le ventricule droit est défaillant, la fraction d'éjection diminue et laisse un volume sanguin résiduel. Conséquemment, le volume sanguin du ventricule durant la diastole est plus élevé. Ce volume plus élevé contribue à rétablir la fraction d'éjection. Le deuxième mécanisme compensatoire emploie les hormones via les systèmes adrénergique et rénine-angiotensine pour tenter de rétablir un flux sanguin adéquat. Le troisième mécanisme, d'intérêt pour le contexte de ce mémoire, est l'hypertrophie du myocarde. Elle est caractérisée par une augmentation de la masse musculaire du myocarde, qui augmente la force de contractilité, pour contrer la résistance interne des tissus vasculaires. Cependant, cette augmentation de masse engendre une perte de volume sanguin retrouvé dans la cavité du ventricule gauche.

L'insuffisance cardiaque, outres ses conséquences physiologiques évidentes, est un stress cellulaire majeur. De manière générale, les processus de production d'énergie, de contraction, de relargage de calcium du réticulum sarcoplasmique (RS) ainsi que le couplage excitation-contraction sont altérés. Plusieurs mécanismes moléculaires sont impliqués dans ces changements. Entre autres, au niveau du cœur, il y a réactivation de gène fœtaux, notamment le *B-type natriuretic peptide* (BNP). Cette protéine est un marqueur impliqué dans la régulation du volume de liquide reçu par le cœur et agit sur le système rénine-angiotensine. D'autre hormones sont également relâchées par le cœur, comme l'*atrial natriuretic peptide* (ANP), une hormone vasodilatatrice relâchée dans la circulation lorsque la paroi auriculaire est étirée (Maisel & Choudhary, 2012). Au niveau de la prolifération cellulaire, la Galectine-3 promouvoit la production de fibroblastes. Certaines kinases sont également activées pour divers aspects de la réponse à l'insuffisance cardiaque, comme CaMKII ou la GRK2 (Cannavo, Liccardo, & Koch, 2013; Wu & Anderson, 2014). Un groupe de kinases est systématiquement surexprimé lors de stress cellulaire : la voie des *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK).

1.6 Voie des *Mitogen Activated Protein Kinase*

Les MAPK sont une série de protéines intracellulaires qui régulent l'homéostasie cellulaire et la transcription génique suite à un stimulus externe dans la plupart des types cellulaires (Cuevas, Abell, & Johnson, 2007). Elles procèdent par phosphorylation successive des kinases en amont vers les kinases en aval (figure 5). Ces phosphorylations sont contrôlées par des interactions avec de multiples protéines d'échafaudage. Il existe trois paliers de kinases, les *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase* (MKKK), *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase* (MKK), et les MAPK.



<u>Figure 5</u> : Voie de signalisation des MAPK

Cette schématisation simplifiée représente les différents paliers de MAP kinases. Leur activation se fait par l'intermédiaire de signaux extracellulaires. Les MAPK p38 (à droite, au centre) partagent une gamme similaire d'activateurs, et possèdent des effecteurs multiples en aval, notamment des facteurs de transcription (tiré de Jeffrey, Camps, Rommel, & Mackay, 2007).

Le premier palier compte plus d'une vingtaine de MKKK activées par GTPases lors d'un stimulus externe et sert essentiellement à l'intégration d'un signal externe en un signal intracellulaire (Cuevas et al., 2007; Johnson, Dohlman, & Graves, 2005). Le deuxième palier est constitué des MKK. Ils sont phosphorylés par les MKKK. Sept gènes ont été identifiés à ce jour (Cuevas et al., 2007), et leur spécificité varie en fonction du type cellulaire étudié ainsi que de leur quantité d'expression (Risco & Cuenda, 2012). À titre d'exemple, la MKK6 peut phosphoryler les MAPK p38, tandis que la MKK7 interagit avec la MAPK *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK) (Haeusgen, Herdegen, & Waetzig, 2011). Les MAPK sont abordées à la section 1.6.1.

La réponse cellulaire dépend des kinases phosphorylées et des substrats en aval. Elles dépendent également de la régulation dans l'espace et dans le temps des MAPK (Johnson et al., 2005). La complexité de ces kinases provient de la spécificité de la réponse cellulaire. En effet, la phosphorylation de ces kinases aux divers paliers par des activateurs parfois redondants peut entraîner des réponses cellulaire différentes selon le contexte d'activation. De surcroît, les kinases d'un même palier peuvent exercer une influence les unes sur les autres ou même s'autophosphoryler (Cuenda & Rousseau, 2007; Risco et al., 2012). Il existe également des boucles de rétroinhibition entre les paliers, comme p38α qui peut déstabiliser l'ARN messager de MKK6, son propre activateur, et donc inhiber sa synthèse (Ambrosino et al., 2003).

1.6.1 MAPK

Les MAPK sont le troisième palier de la cascade de phosphorylation et sont les substrats des MKK. Il existe cinq familles de MAPK encodées dans onze gènes : les *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), les JNK, ERK5, ERK7, et les p38 (Cuevas et al., 2007; Johnson et al., 2005). Chacune des MAPK est activée différemment. Les ERK sont principalement activées par des agents mitogènes et des facteurs de croissance. JNK et p38 sont activées par des stress cellulaires comme les cytokines, un choc osmotique, ou une ischémie. Dans le cœur, toutes les MAPK peuvent être activées par l'intermédiaire des MKKK, mais ces dernières possèdent également des substrats indépendants de la cascade de phosphorylation et peuvent affecter la survie des cellules cardiaques par d'autres moyens (Muslin, 2005).

1.6.1.1 P38

Les MAPK p38 sont des sérine/thréonine kinases qui partagent des homologies de séquence d'environ 60% (Cuenda & Rousseau, 2007). Leur structure générale est composée d'un domaine kinase davantage en N-terminal dans lequel se situe le motif de phosphorylation TGY, et un domaine de liaison commun (*Common Docking*, ou *CD domain*) davantage en C-terminal qui permet la liaison de différentes phosphatases (Huang & Tan, 2012; Lukas et al., 2004). Ils partagent les mêmes activateurs en amont, les MKK, mais n'agissent pas nécessairement sur les mêmes substrats en aval (Cohen, 1997; Enslen, Brancho, & Davis, 2000; Enslen, Raingeaud, & Davis, 1998). À ce jour, quatre isoformes de p38 ont été identifiées : α, β, γ et δ (Keesler et al., 1998). Bien que les quatre isoformes soient exprimées dans le cœur (Court, dos Remedios, Cordell, & Bogoyevitch, 2002; Keesler et al., 1998), deux d'entre elles sont prédominantes : p38α et p38γ (Dingar et al., 2010). La disponibilité d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques et généraux a facilité les études sur la fonction de p38α dans les cardiomyopathies (Burnette et al., 2009; Cuenda & Rousseau, 2007; Kuma et al., 2005). Son rôle est essentiellement cardiotoxique et promeut l'apoptose (Y. Wang, 1998). Les données concernant p38β et p38δ dans le cœur sont maigres, et leur rôle spécifique demeure incompris à ce jour dans la pathologie cardiaque.

Parmi les quatre isoformes, p38γ représente un sujet d'étude intéressant. Elle est caractérisée par la présence d'un motif de liaison aux domaines PDZ en C-terminal, absent chez les autres isoformes (Seta & Sadoshima, 2002). Ce motif de liaison aux PDZ permet de cibler des substrats multiples dont les fonctions semblent indépendantes (Hasegawa et al., 1999; Sabio et al., 2005, 2010). Un partenaire d'interaction connu de p38γ est hDlg, une protéine d'échafaudage impliquée entre autres dans l'adhésion cellulaire (Sabio et al., 2005). De plus, p38γ semble exercer un rôle important dans la différenciation et la prolifération cellulaire (Gillespie et al., 2009; Kukkonen-Macchi et al., 2011; Risco & Cuenda, 2012; Rosenthal et al., 2011). P38γ exerce entre autres un rôle dans la régulation de certains facteurs de transcription, dont MyoD. Ce facteur est important dans la différenciation et la prolifération des cellules musculaires en activant l'expression de la myogénine (Gillespie et al., 2009). Dans le muscle squelettique, la

délétion de p38γ entraîne une perte de masse musculaire et une diminution du diamètre des myofibres (Foster, Tidball, & Wang, 2012). Dans la pathologie cardiaque, son rôle demeure à élucider, mais son action semble parfois contraire à p38α sur l'activation de certains gènes (Askari et al., 2007; Qi et al., 2007). La localisation cellulaire de p38γ varie également dans des cas de constriction vasculaire et se relocalise au noyau, contrairement à sa consoeur p38α, qui transloque vers le cytoplasme (Dingar et al., 2010).

1.7 Objectifs de l'étude

Compte tenu que les cardiomyocytes subissent des changements morphologiques compensatoires en condition de stress pathologique, que p38γ possède un motif de liaison aux domaines PDZ unique chez les MAPK, et que p38γ se relocalise au noyau dans ces conditions, l'objectif général de l'étude est de déterminer le rôle de p38γ chez les cardiomyocytes en condition de stress. Plus spécifiquement, le rôle du motif de liaison aux domaines PDZ ainsi que la localisation cellulaire de p38γ seront à l'étude. L'approche utilisée pour étudier ces deux éléments est la mutagenèse d'addition ou de délétion de la protéine. Le modèle à l'étude est le cardiomyocyte de rat nouveau né en culture.

La finalité de ces observations est de fournir un fil conducteur dirigeant vers un meilleur discernement du rôle général de p38γ chez les cardiomyocytes. Les études subséquentes pourront raffiner les relations de causalité qui impliquent p38γ, ses activateurs et ses effecteurs en condition de stress.

Matériel et méthodes

2.1 Matériel

Les adénovirus du mutant constitutivement actif de MKK6 et de la β-galactosidase, ainsi que les plasmides pUC57 contenant les séquences NLS et NES sont des généreux dons du laboratoire du professeur Jeffery Molkentin (Cincinnati, USA).Les plasmides pCMV-SPORT6 encodant les gènes p38α et p38γ, les inhibiteurs de protéases et de phosphatases HALT, ainsi que Triton X-100 sont des produits de Thermo Fisher Scientific (Ottawa, ON). Le plasmide p3xFLAG CMV 7.1, le colorant à acide nucléique Hoechst et l'anticorps de souris dirigé contre l'étiquette 3xflag proviennent de Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Les enzymes de restriction, la polymérase Phusion, la polymérase Q5 ainsi que la T4 ligase sont des produits de New England Biolabs (Pickering, ON). Les plasmides pUC57 encodant une étiquette 3xflag ainsi qu'un signal de localisation nucléaire (NLS, *Nuclear Localization Sequence*) et la séquence d'exportation nucléaire (NES, *Nuclear Export Site*), le chloramphénicol et le dithiotréitol ont été acquis chez Bio Basic (Markham, ON). Les plasmides et enzymes de recombinaison homologue *in vitro* du système Gateway®Cloning proviennent d'Invitrogen (Burlington, ON). Sont également d'Invitrogen le milieu de transfection Opti-MEM, l'agent de transfection Lipofectamine 2000, l'agent de coloration de l'actine Texas Red Phalloidin, ainsi que l'anticorps de lapin anti-IgG de souris Alexa Fluor 488. L'ampicilline et les désoxynucléotides dNTP proviennent de Roche Diagnostics (Basel, Suisse). Les produits de culture cellulaire ainsi que la kanamycine proviennent de Wisent (Saint-Bruno, Qc). Les cellules HEK293A proviennent de American Type Culture Collection (Manassas, VE). Les produits de dosage protéique (*DC protein assay*), ainsi que les produits requis pour les gels d'acrylamide proviennent de Biorad (Mississauga, ON) à l'exception du Phos-Tag, qui provient de Wako Chemicals USA (Richmond, VE). Les membranes de polyvinylidenefluoride (PVDF) sont de Pall Corporation (Mississauga, ON), l'anticorps secondaire anti-souris de mouton couplé à la peroxydase de raifort est de GE Healthcare (Waukesha, WI), et le peroxyde d'hydrogène Luminata est de Millipore (Billerica, MA). Le matériel d'imagerie de gels d'électrophorèse et d'immunobuvardage provient de Biorad, tandis que le microscope confocal FluoView est de Olympus (Markham, ON). La trousse de purification *Wizard SV gel and PCR clean-up system* provient de Promega (Madison, WI).

2.2 Méthodes

2.2.1 Constructions plasmidiques

Les diverses constructions plasmidiques des gènes p38α (BC012235) et p38γ (BC021640) ont été réalisées dans le vecteur de destination p3xFLAG CMV 7.1. Ce vecteur contient trois étiquettes FLAG successives en N-terminal du gène, qui est inséré dans le site de clonage multiple directement en aval de cette étiquette. Les sites HindIII et BamHI ont été utilisés en 3' et 5' respectivement, à l'exception des constructions additionnées des NLS ou NES, pour lesquels les sites HindIII, SalI et BamHI ont été employés lors d'une double ligation. Le vecteur de destination a été digéré par les enzymes de restriction HindIII et BamHI pour toutes les constructions à 37 degrés durant deux heures. La séparation de l'insert et du plasmide résultants a été effectuée par extraction sur gel d'agarose. Les fragments NLS et NES ont été retrouvés par digestion enzymatique de leur plasmide pUC57 respectif avec les enzymes HindIII et SalI. Les fragments ont été séparés sur gel d'agarose 2% et extraits par découpage de ce gel. Les gènes P38α et p38γ ont été amplifiés par réaction en chaîne par polymérase (PCR, *polymerase chain reaction*) et purifiés à l'aide de la trousse de purification *Wizard SV gel and PCR clean-up system*. Les digestions des inserts purifiés des gènes ont été effectuées à 37 degrés durant 1 heure, suivies d'une inactivation des enzymes de restriction par la chaleur à 65 degrés durant 20 minutes. Les ligations ont été effectuées avec 400 unités de T4 ligase dans le tampon de ligase (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl2, 1 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7,5) à température pièce pendant une heure. Les réactions de ligations ont été transformées dans la souche bactérienne DH5α. Les colonies ont été criblées par digestion enzymatique. Le tableau 1 résume les constructions, les sites de restriction et les amorces utilisées pour chacune des constructions plasmidiques.

2.2.2 Mutagénèse dirigée

La mutagénèse dirigée est effectuée par PCR de type *around the horn* (Moore, 2013). Brièvement, les oligonucléotides employés ont été devisés pour chevaucher les nucléotides à muter. 10 µM des amorces ont été phosphorylées à 37 degrés pendant 60 minutes dans une solution contenant un tampon kinase, 1mM MgSO4, 2 mM ATP et 1 µL *Polynucleotide kinase* PNK. La réaction a été interrompue par inactivation à la

chaleur, 20 minutes à 65 degrés. Une réaction PCR des amorces phosphorylées sur les plasmides entiers a ensuite été effectuée, suivie d'une ligation avec la T4 ligase tel que décrit dans la section précédente. Les plasmides ont été transformés dans des DH5α, et les colonies subséquentes criblées par séquençage (service offert par la Plateforme de séquençage et de génotypage des génomes – CHUQ, Québec, Canada).

Tableau 1 : **Constructions plasmidiques vers p3xFLAG CMV 7.1**

Construction	Site de restriction	Amorces
p3xFLAG p38γ	HindIII - BamHI	gaaaagaagcttagctccccgccac
		caaaacggatcctcacagagccgtctcct
p3xFLAG p38γ KETXL	HindIII - BamHI	gaaaagaagcttagctccccgccac
		ctttttcggatcctcatggaactctggctcctagctgcctaggagg
p3xFLAG NES p38γ	HindIII - SalI - BamHI	caaaaacgtcgacagctccccgccac
		caaaacggatcctcacagagccgtctcct
p3xFLAG NLS p38γ	HindIII - SalI - BamHI	caaaaacgtcgacagctccccgccac
		caaaacggatcctcacagagccgtctcct
p3xFLAG NLS p38γ KETXL	HindIII - SalI - BamHI	gaaaagaagcttagctccccgccac
		ctttttcggatcctcatggaactctggctcctagctgcctaggagg
p3xFLAG p38γ dominant négatif	Mutagénèse	gcaggagctgtggtaacccggtggtatc
		catctcactgtctgcctgc
	HindIII - BamHI	gaaaagaagcttagctccccgccac
		caaaacggatcctcacagagccgtctcct
p3xFLAG p38α	HindIII - BamHI	gaaaagaagctttcgcaggagaggcc
		caaaacggatcctcaggactccatttcttcttgg

2.2.3 Recombinaisons adénovirales

2.2.3.1 Sous-clonage des constructions dans le vecteur pENTR 3C Dual Selection

Les constructions identifiées au tableau 1 ont été sous-clonées par PCR à l'aide d'amorces en amont de la séquence Attl1 et en aval de la séquence Attl2 du vecteur pENTR 3C Dual Selection (Invitrogen). La méthode de sous-clonage employée est identique à celle retrouvée à la section 2.2.1. à l'exception des sites de restriction utilisés. Le criblage a également été confirmé par séquençage. Le tableau 2 résume les oligonucléotides et sites de restriction employés pour chacune des constructions.

Tableau 2 : Constructions plasmidiques vers pENTR 3C Dual Selection

Vecteur initial	Vecteur de destination	Restriction	Amorces
Constructions p3xFLAG p38γ	Pentr 3C Dual Selection	Kpn1 - Not1	gaactctagcggccgcatggactacaaagaccatgacggt
			ctctagcggccgcagccaagattgtgccactgcac
p3xFLAG p38α		Not1 - Xho1	gaactctagcggccgcatggactacaaagaccatgacggt
			ctctactcgagagccaagattgtgccactgcactc

2.2.3.2 Recombinaison *in vitro* dans le vecteur pAD/CMV/V5-DEST

Les recombinaisons ont été effectuées suivant les directives du manuel d'instructions fourni avec les vecteurs nécessaires. Les constructions sous-clonées dans pENTR 3C Dual Selection ont été ajoutés au plasmide pAD/CMV/V5-DEST à un ratio équimolaire en présence de 2 µl du cocktail d'enzymes de recombinaison LR de la trousse de recombinaison d'Invitrogen. La réaction a été effectuée pendant 24 heures à 25°, puis la totalité de celle-ci a été transformée dans la souche bactérienne TOP10. Les clones ont été criblés par PCR sur colonie, par digestion enzymatique avec l'enzyme de restriction XhoI, par culture différentielle en bouillon contenant soit de l'ampicilline, soit du chloramphénicol, et par séquençage.

2.2.3.3 Amplification adénovirale

Quatre µg des constructions pAD/CMV/V5-DEST ont été transfectés dans la lignée cellulaire HEK293A dans une plaque à 6 puits selon le protocole de transfection décrit à la section 2.2.4.2. Les milieux de culture ont été récoltés suivant la lyse des cellules, soit de sept à dix jours post-transfection. Les milieux ont ensuite été soumis à trois cycles de gel-dégel et centrifugés pendant dix minutes. Un ml de ce lysat viral a été amplifié dans un pétri de 10 cm de cellules HEK293, et récolté après la lyse quasi-totale des cellules.

2.2.4 Expérimentations sur cellules en culture

2.2.4.1 Culture cellulaire

Les cellules HEK293A et COS7 ont été cultivées dans le Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin, 2,5 mM glutamine, 50 IU pénicilline et 50 mg/ml streptomycine dans un incubateur à 37ºC alimenté à 5% de CO_2, et 100% d'humidité. Les *rat neonate ventricular cardiomyocytes* (RNVC) ont été maintenus dans du α-MEM plutôt que du DMEM.

2.2.4.2 Transfection

Les transfections ont été effectuées selon le protocole de la lipofectamine 2000. Brièvement, selon les quantités utilisées dans un puits de plaque à 6 puits, 4 µg de plasmide sont ajoutés à 500 µl d'opti-MEM, et 12 µl de Lipofectamine 2000 sont laissés à incuber pendant cinq minutes dans 500 µl d'opti-MEM à température pièce. La solution contenant le plasmide est ensuite incorporée à la Lipofectamine 2000 avec une incubation de 20 minutes à température pièce. La totalité de la solution est déposée dans un puits de la plaque. Les cellules transfectées sont incubées pendant une période de 16 à 48 heures, selon l'application ultérieure.

2.2.4.3 Infection adénovirale

Toutes les infections adénovirales s'effectuent par l'ajout de lysat viral amplifié à la culture cellulaire, ensuite laissé à incuber pour une période variant de 16 à 48 heures, selon l'application ultérieure.

2.2.4.4 Gel polyacrylamide et immunobuvardage

Le milieu de culture a d'abord été retiré des cellules, qui sont lavées une fois au PBS froid. 150 µl de tampon X-RIPA modifié (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 4% Glycérol, 0,5 mM NaMetabisulfite, 1 % Triton X-100, 0,1 % NaDeoxycholate, 0,05 % SDS, 1 mM DTT, Inhibiteur de protéase HALT) sont ensuite ajoutés aux cellules pour en effectuer la lyse avant de les récolter. Ces dernières sont récoltées à

l'aide d'un grattoir à cellules dans un tube 1,5 ml pour être soumises à trois sonications successives. Le lysat est centrifugé à 14 000 x *g* pendant dix minutes pour culotter les débris cellulaires. Les protéines de la solution sont dosées à l'aide de la trousse de DC *protein assay* de Biorad selon leur protocole fourni. Brièvement, cinq µl de protéines sont dilués dans 195 µl d'eau auxquelles sont ajoutées 98 µl de réactif A et deux µl de réactif S. Après dix minutes d'incubation à température ambiante, 800 µl de réactif B sont ajoutés et laissés à incuber pour 30 minutes à température ambiante. Le dosage est effectué par spectrophotométrie à 750 nanomètres. La concentration protéique est déterminée à l'aide d'une courbe de dosage d'albumine de sérum bovin (BSA).

Pour l'immunobuvardage, les échantillons protéiques ont été séparés par gel d'acrylamide 8%. Les protéines séparées ont ensuite été transférées sur une membrane de *Polyvinilidene Fluoride* (PVDF) pendant 1 heure à 100 volts.

Les gels d'acrylamide de type Phos-Tag ont été effectués selon la même méthode avec les différences suivantes. Le tampon X-RIPA modifié et le gel d'acrylamide ne contiennent pas d'EDTA, la vitesse de migration est réduite à 60 volts, et la vitesse de transfert sur membrane PVDF est réduite à 80 volts pendant 1h30. La membrane a été bloquée avec une solution de TBS (Tween 0,1%, pH 7,5) contenant 2% de lait. Cette même solution a servi pour la dilution des anticorps primaires et secondaires employés. L'application de l'anticorps primaire ou secondaire a été suivie par 3 lavages de 10 minutes au TBS-Tween. La détection des bandes a été effectuée par l'exposition des anticorps secondaires à leur substrat via le réactif Luminata (Millipore) suivie par la lecture de l'intensité du signal avec l'appareil d'imagerie moléculaire Versadoc MP4000 de BioRad.

2.2.4.5 Microscopie Confocale

Le milieu de culture des cellules a été retiré, et ces dernières ont été lavées une fois au PBS froid. Les cellules ont ensuite été fixées dans une solution de paraformaldéhyde (3% dans PBS) pendant 30 minutes à l'abri de la lumière, à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois avec du PBS. Les cellules ont ensuite été exposées

à une solution de désactivation (NH_4Cl 50 mM) durant dix minutes à l'abri de la lumière. Une solution de blocage (PBS avec 10% FBS) a été utilisée par la suite. Cette même solution est utilisée pour la dilution des anticorps primaires et secondaires. Une solution de PBS contenant 1% de FBS est employée lors des lavages. Les noyaux ont été colorés à l'aide du hoechst et l'actine est colorée avec la phalloïdine TX-RED pendant une heure à l'abri de la lumière.

Les lamelles sur lesquelles sont fixées les cellules ont par la suite été déposées sur 5 µl de solution de montage (N-propylgallate 1%) sur lame, puis scellées avec du vernis à ongles. La fluorescence des anticorps secondaire a été observée à l'aide d'un microscope confocal Olympus FluoView disponible à l'institut de Pharmacologie de l'Université de Sherbrooke.

2.2.5 Mesure de la taille cellulaire

La prise de photo des cardiomyocytes a été effectuée à l'aide d'un microscope à épifluorescence disponible à l'institut de Pharmacologie de l'Université de Sherbrooke. La taille des cellules a ensuite été évaluée à partir de micrographes à l'aide du programme ImageJ. Les calculs statistiques d'analyse de variance concernant la taille cellulaire ont été réalisés avec la version 3,06 gratuite du logiciel GraphPad InStat, de *GraphPad Software Inc*.

2.2.6 Phosphorylation de p38γ

Les stimulations de p38γ par MKK6 constitutivement actif ont été effectuées par co-infection. Les stimulations par sorbitol ont été effectuées par l'exposition des cardiomyocytes à une solution de α-MEM contenant 0,5 M sorbitol pendant 20 minutes avant leur récolte (Kuma et al., 2005) à 37°C avec 5% CO_2. Les stimulations par anisomycine ont été réalisées en exposant les cardiomyocytes à une solution de α-MEM contenant 1 µg/ml d'anisomycine dans les mêmes conditions que le traitement au sorbitol (Remy et al., 2010).

2.2.7 Fractionnement du sarcoplasme et du noyau

La méthode employée est tirée de Suzuki *et al*, 2010 (Suzuki, Bose, Leong-Quong, Fujita, & Riabowol, 2010). Les milieux des pétris contenant des cardiomyocytes en culture ont été aspirés, puis les cellules ont été rincées une fois au PBS froid. 900 µl de Nonidet-P 40 (NP-40, 0,1% dans du PBS) ont été ajoutés au pétri. Les cellules ont ensuite été décollées au grattoir à cellules, et les 900 µl ont été récoltés dans un tube 1,5 ml. Les cellules ont été broyées à l'aide d'une pipette P1000. 300 µl de ce mélange ont été prélevés comme lysat total et 100 µl de tampon de Laemmli 4x y ont été ajoutés. Les 600 µl restants ont été centrifugés brièvement à 18 000 x *g*. 300 µl du surnageant ont été recueillis comme phase sarcoplasmique et 100 µl de tampon de Laemmli 4x y ont été ajoutés. Les 300 µl restant ont été retirés, et 1 ml de NP-40 0,1% a été ajouté au culot. Le culot a été resuspendu, puis centrifugé à 18 000 x *g* brièvement. Le surnageant a été retiré, et 180 µl de tampon de Laemmli 1x ont été ajoutés au culot. Cette phase constitue le lysat du noyau. Les phases contenant le lysat total ou le noyau ont été soniquées deux fois durant cinq secondes.

RÉSULTATS

3.1 Constructions plasmidiques

L'objectif de l'étude est de comprendre l'influence de p38γ et ses motifs sur la structure des cardiomyocytes. Les constructions schématisées à la figure 6 ont été générées pour répondre aux objectifs de l'étude. Parmi ces mutants se retrouvent p38γ tronqué en C-terminal de son motif de liaison aux domaines PDZ (ΔKETAL), un mutant d'addition d'un motif d'export ou d'import au noyau et un mutant non phosphorylable. Le motif KETAL est parfois représenté KETXL, car l'alanine est le seul acide aminé non conservé dans ce motif ; les deux appellations seront donc employées. La génération des constructions dans le vecteur P3xFLAG CMV 7.1 a permis d'ajouter au gène p38γ l'étiquette FLAG en N-terminal. Les sites de restrictions employés lors des digestions, HindIII, SalI et BamHI, ont été sélectionnés à la fois car ils ne se retrouvent pas dans p38γ et car ils n'interfèrent pas avec les sites de restriction disponibles sur le vecteur pENTR 3C Dual Selection employé pour la génération d'adénovirus. Les constructions, générées par sous-clonage, ont été criblées par digestion sur gel d'agarose 0,8%. Les résultats positifs relâchaient un insert de 1 100 paires de base, correspondant à p38γ, ainsi qu'un fragment de 4 700 paires de base, représentant le plasmide p3xFLAG CMV 7.1 (figure 7).

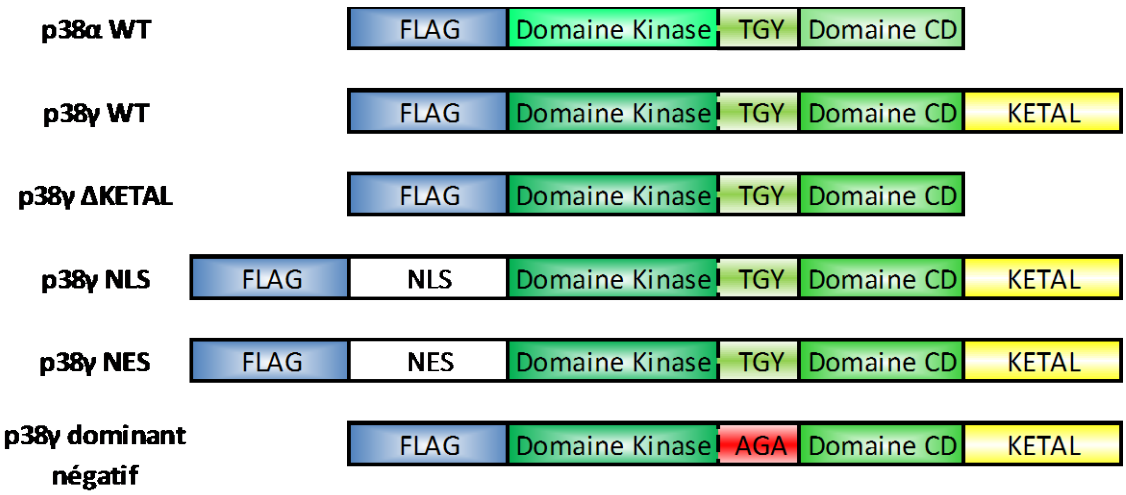
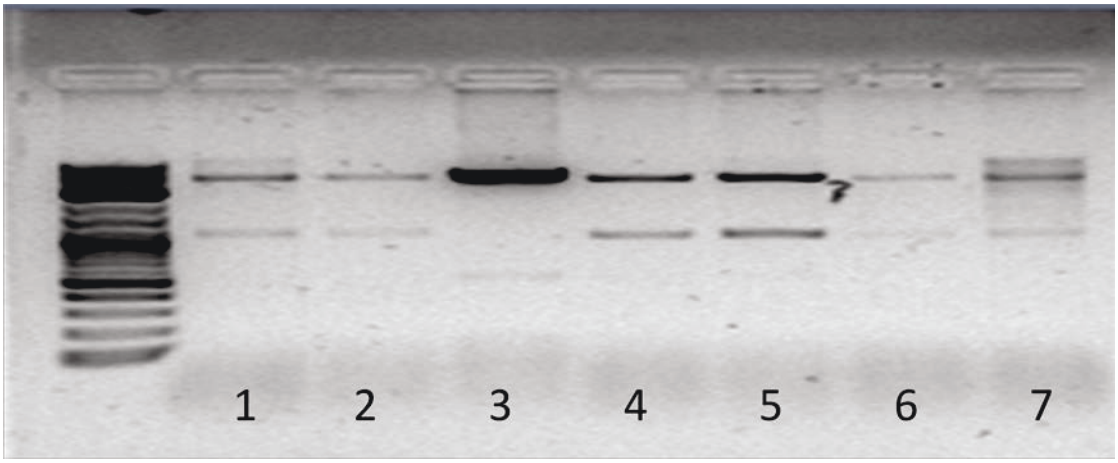


Figure 6 : Représentation schématique des constructions de p38

Les protéines natives et les mutants de p38 ont été générés avec l'épitope FLAG pour faciliter le suivi. Les structures du domaine kinase et du domaine CD, qui permet la liaison kinases activatrices et aux phosphatases inhibitrices, sont maintenues intactes.



<u>Figure 7</u> : **Criblage de clones du gène p38γ inséré dans p3xFLAG CMV 7.1**

L'ADN plasmidique des clones issus de colonies de DH5α transformées avec le produit de sous-clonage est extrait par lyse alcaline. Les plasmides sont digérés par HindIII et BamHI, et séparés sur gel d'agarose 0,8%. Le puits 3 démontre une relâche du vecteur de destination (4700 paires de base), mais un insert de mauvais poids moléculaire. Les clones des autres puits relâchent l'insert attendu de p38γ à 1100 paires de base.

Le plasmide p3xFLAG CMV 7.1 est inductible en culture cellulaire et peut être transfecté. Afin de s'assurer que les constructions sont proprement exprimées en milieu cellulaire, elles ont été transfectées dans des COS7 et observées au microscope confocal. Les constructions munies d'un NLS et NES se situent au noyau et hors du noyau, respectivement (figure 8). La construction native de p38γ, ainsi que la construction ΔKETAL sont bel et bien exprimées et se retrouvent à la fois au noyau et au cytoplasme.

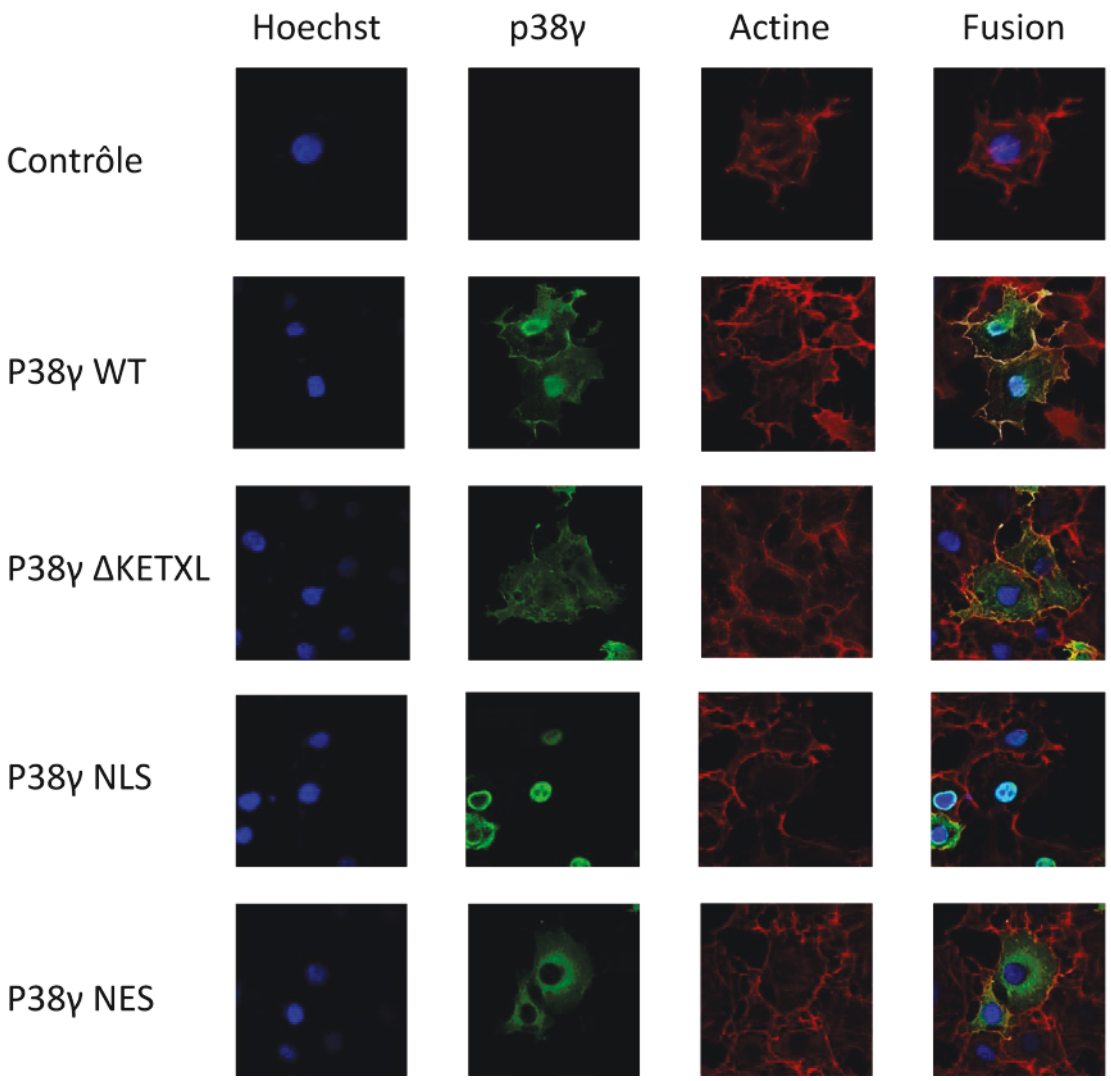


Figure 8 : Expression des mutants de la kinase p38γ dans les COS7

L'expression et la localisation des différentes constructions de p38γ (vert) chez les cellules COS7 ont été observées par microscopie confocale 48 heures suivant la transfection. La localisation au noyau des différentes constructions ou leur exclusion du noyau est facilitée par l'identification des filaments d'actine marqués à la phalloïdine TX-Red (rouge) et des noyaux marqués au Hoechst (bleu).

3.2 Constructions adénovirales

Le modèle cellulaire à l'étude est les RNVC. Étant donné que le taux de transfection dans ces cultures primaires est très faible, il faut recourir à l'utilisation d'infection virale pour un meilleur résultat. Pour ce faire, les constructions pourvues de l'étiquette FLAG dans le vecteur p3xFLAG CMV 7.1 ont été sous-clonées par PCR vers le vecteur pENTR 3C Dual Selection. L'usage d'oligonucléotides communs lors du sous-clonage

permettait une normalisation des paramètres de cette étape pour toutes les constructions, et le processus en était grandement accéléré. Un profil de digestion par enzymes de restriction a permis l'identification de clones potentiels à envoyer séquencer (figure 9).

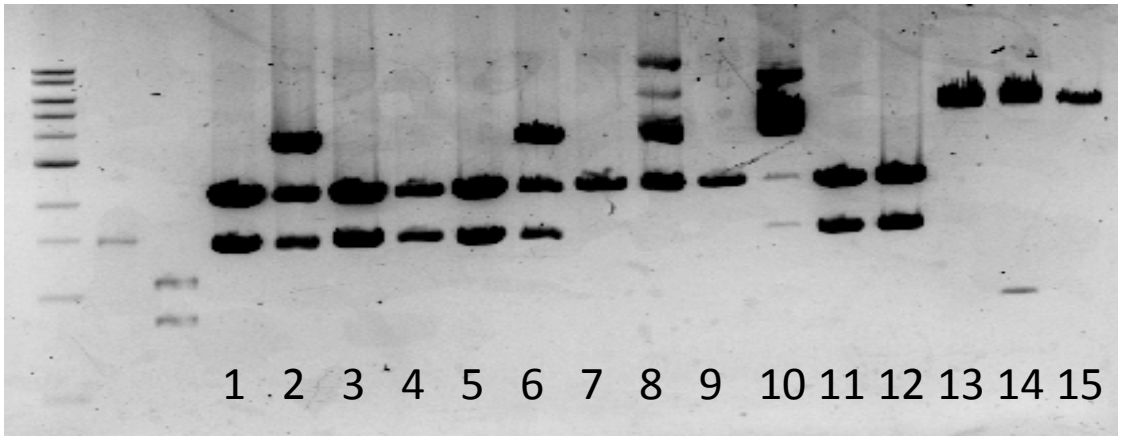


Figure 9: Criblage de clones du gène p38γ dans pENTR 3C Dual Selection

L'ADN plasmidique des clones issus de colonies de DH5α transformées avec le produit de sous-clonage est extrait par lyse alcaline. Les plasmides sont digérés par KpnI et NotI, et séparés sur gel d'agarose 0,8 %. Les bandes attendues du plasmide et de l'insert des clones positifs, tel qu'obtenu chez les clones des puits #1-6 et 10-12, sont d'une taille de 2500 et 1400 paires de bases, respectivement.

Le vecteur pENTR 3C Dual Selection fait partie du système Gateway®Cloning et permet une génération facile d'adénovirus. Il encode des séquences Attl1 et Attl2 de part et d'autre du gène qui est ajouté, ce qui permet une recombinaison homologue de type LR vers le vecteur pAD/CMV/V5-Dest. Lors de la recombinaison, ses gènes de résistance au chloramphénicol et son ccdB sont échangés avec p38γ retrouvé dans le plasmide pENTR. Étant donné le faible taux de recombinaison et de transformation dans les bactéries TOP10, trois criblages ont été effectués. Le premier consistait en une différentielle de culture en bouillon en présence soit d'ampicilline, soit de chloramphénicol. Les clones positifs *à priori* proliféraient en présence d'ampicilline seulement (résultats non montrés). Ces clones ont été sélectionnés pour le deuxième criblage par PCR. Deux PCR d'amplification de 500 paires de bases ont été effectués, un dans la région N-terminale et un autre dans la région C-terminale de la kinase. L'amplification chevauchait également des fragments du vecteur pAD/CMV/V5-DEST. Les clones sélectionnés étaient positifs sur les deux PCR effectués (figure 10a). Le

troisième criblage était un profil de digestion par enzyme de restriction. Le site XhoI est présent une fois dans la région de recombinaison du vecteur pAD/CMV/V5-DEST et est absent dans la séquence de p38γ. Le vecteur sans recombinaison est attendu à générer un profil de 5 bandes et les clones de recombinaison, seulement 4 (figure 10b).

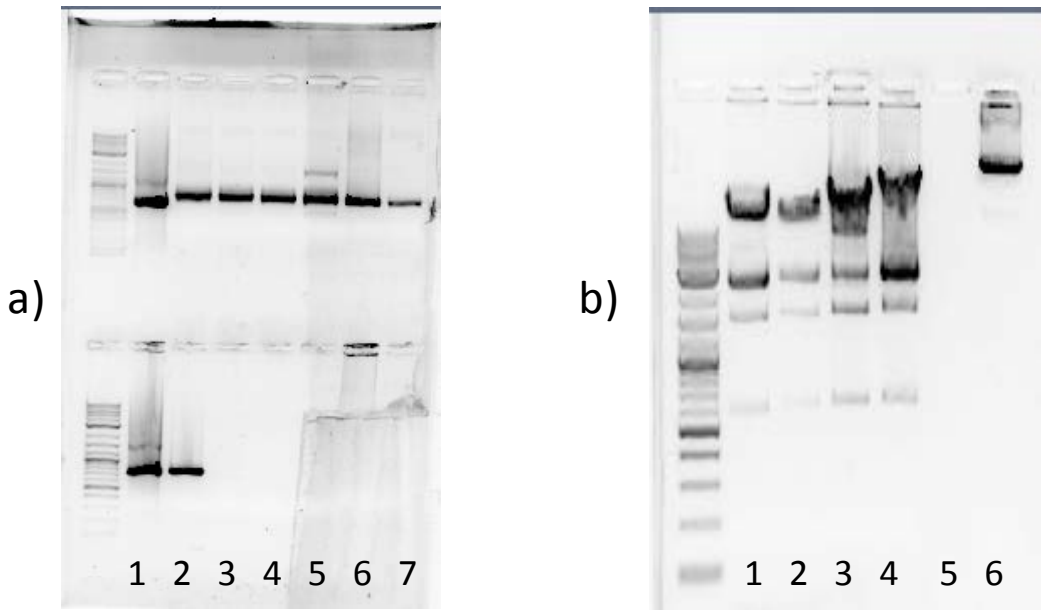


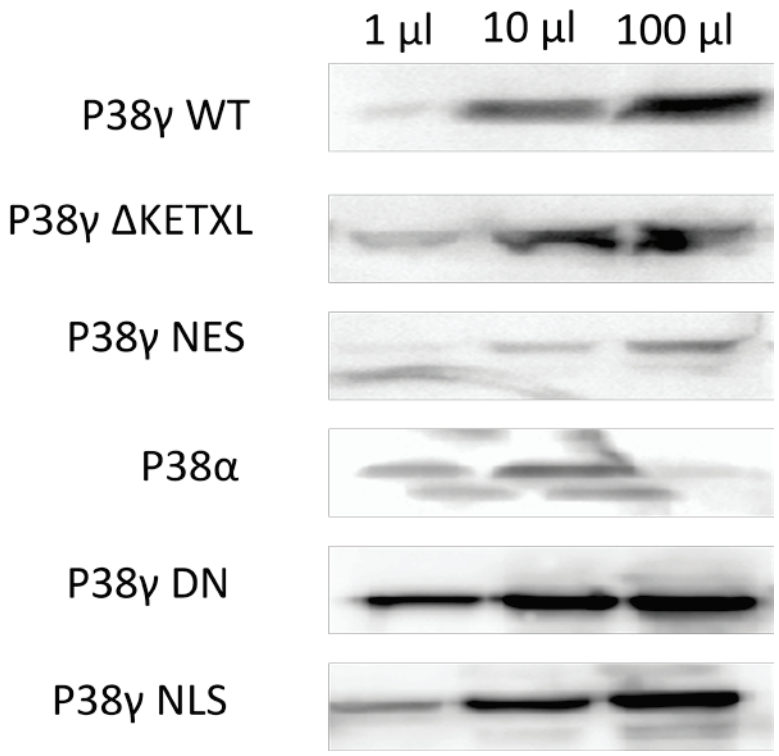
Figure 10 : Criblage des recombinaisons homologues pAD/CMV/V5-DEST

a) Criblage par PCR des recombinaisons homologues. Les inserts générés sont issus de régions se retrouvant à la fois sur p38γ et le vecteur pAD/CMV/V5-DEST. La partie supérieure du gel représente les inserts recoupant la partie N-terminale du gène à partir de 7 clones différents. La partie inférieure du gel représente les inserts issus de la partie C-terminale de p38γ des mêmes 7 clones. Les clones ayant des bandes à la fois en N- et en C-terminal sont considérés positifs. b) Digestion enzymatique des clones par XhoI. Les puits 1 et 2 sont des clones criblés du gène p38γ, le puits 3 est pAD/CMV/V5-DEST, et le puits 4 est un clone révélé positif. La disparition de la deuxième bande du haut retrouvée au vecteur de destination indique l'inclusion du gène d'intérêt. Les puits 5 et 6 montrent la grande variabilité qui peut être retrouvée lors de l'extraction d'ADN et sont des clones négatifs.

3.3 Expression et localisation cellulaire des constructions adénovirales

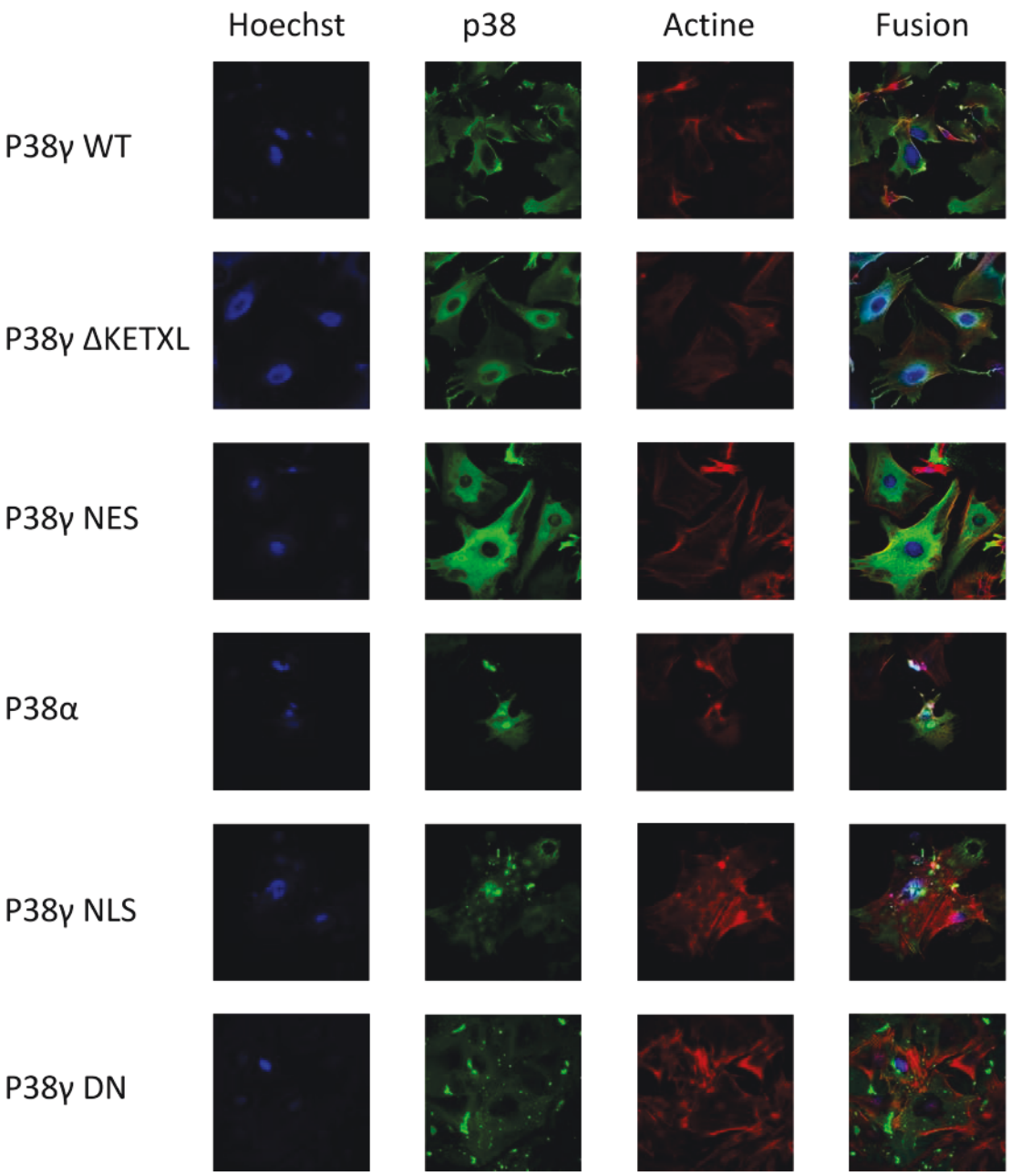
Une fois les constructions adénovirales complétées, il faut s'assurer que leur protéine soit bien exprimée. L'expression des adénovirus des mutants de la figure 6 a été vérifiée chez les COS7 en culture par immunobuvardage et par microscopie confocale. L'immunobuvardage dirigé contre l'épitope FLAG montre que les adénovirus sont tous exprimés (figure 11). Le niveau d'expression est observé selon une infection de 1 µl,

10 µl ou 100 µl du lysat viral. Les photographies de microscopie confocale des infections montrent la localisation cellulaire de l'expression des adénovirus. Les adénovirus des constructions identifiées à la figure 6 démontrent une localisation similaire à ces dernières à l'exception du mutant NLS, qui montre une expression ponctuelle (figure 12). Le mutant non phosphorylable de p38γ montre une expression similaire au mutant NLS. L'adénovirus de p38α exprime une protéine située au noyau et au cytoplasme.



<u>Figure 11</u> : Expression des adénovirus des mutants de p38

Les cellules COS7 en culture ont été infectées par un gradient de quantité du lysat brut des adénovirus générés en HEK293A. Le niveau d'infection observé peut être corrélé à l'intensité des bandes.



<u>Figure 12</u> : Localisation cellulaire des infections adénovirales de p38

La localisation et l'expression des différents mutants adénoviraux de p38γ ont été observées suite à l'infection de cardiomyocytes de rats nouveau-nés. Les noyaux et l'actine ont été colorés afin de situer les protéines par rapport au cytoplasme et au noyau.

3.4 Phosphorylation de p38γ

La MAPK p38γ est une protéine phosphorylée dans des conditions de stress cellulaire et transloquée au noyau des cardiomyocytes (Dingar et al., 2010). Afin d'identifier un activateur optimal *in vitro*, nous avons observé l'activation de p38γ par le mutant constitutivement actif de sa kinase activatrice en amont MKK6 (MKK6ca), le sorbitol et l'anisomycine (figure 13). Au niveau basal, p38γ se retrouve dans un état non phosphorylé, et son expression est principalement au cytoplasme. En contrepartie, p38γ est phosphorylé par les trois stimuli, avec un niveau de phosphorylation croissant de l'anisomycine au sorbitol à MKK6ca. La localisation au noyau de p38γ non phosphorylé est davantage marquée en présence de MKK6ca et est la plus faible en présence de l'anisomycine (Remy et al., 2010). Les niveaux de p38γ phosphorylé au noyau demeurent inférieurs au seuil de détection.

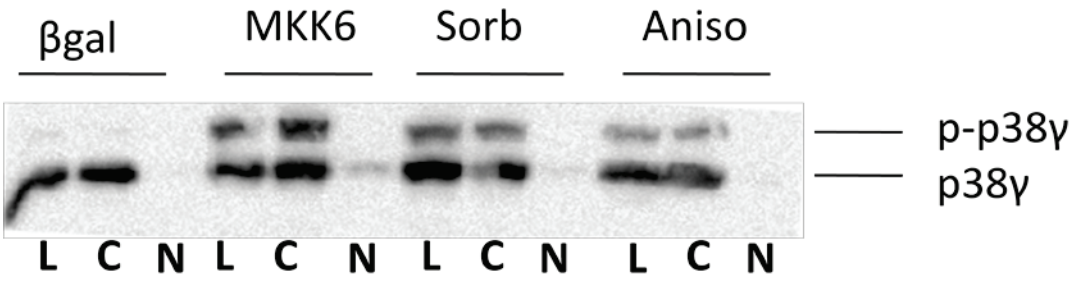


Figure 13 : Phosphorylation de la kinase p38γ détectée par gel de type Phos-Tag

Des cardiomyocytes en culture ont été infectés par un adénovirus de la protéine p38γ. La MAPK kinase MKK6ca a été ajoutée au même moment que l'infection, tandis que le sorbitol et l'anisomycine ont été ajoutés 20 minutes avant la récolte des cardiomyocytes. Pour chacune des conditions, les trois puits sont le lysat total (L), le cytoplasme (C), et le noyau (N). (Sorb = sorbitol ; Aniso = anisomycine ; p- p38γ = p38γ phosphorylé)

L'effet de MKK6ca sur la localisation cellulaire et sur la phosphorylation des mutants chez les cardiomyocytes a ensuite été évalué par immunobuvardage de type Phos-Tag (figure 14). Les mutants ΔKETXL et NES présentent une augmentation de la phosphorylation en présence de MKK6ca comparativement à leur infection en présence de β-galactosidase. Les mutants p38γ DN ainsi que p38α ne montrent pas de phosphorylation marquée en présence de MKK6ca. De manière assez intéressante, le mutant p38γ NLS montre des niveaux de phosphorylation équivalents à la protéine non

phosphorylée autant en présence de la β-galactosidase que de MKK6ca. Également, cette proportion de phosphorylation semble plus élevée que les niveaux retrouvés chez le mutant de type sauvage, ΔKETXL et NES. La différence de migration entre le mutant NLS phosphorylé et la protéine native phosphorylée est cependant moins marquée. Enfin, les mutants ΔKETXL, DN et NLS montrent une localisation au noyau supérieure à p38γ de type sauvage en présence de β-galactosidase.

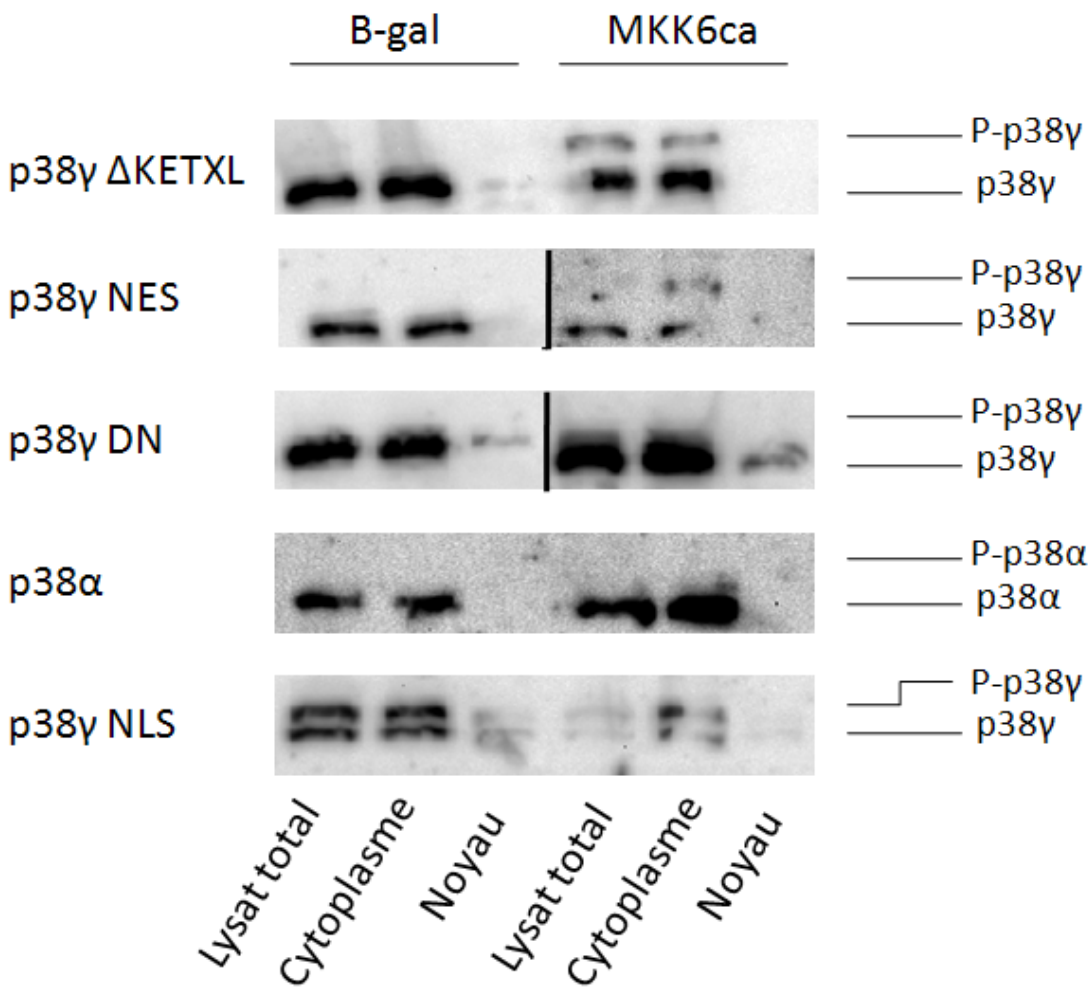


Figure 14 : Phosphorylation et localisation cellulaire des mutants de p38γ

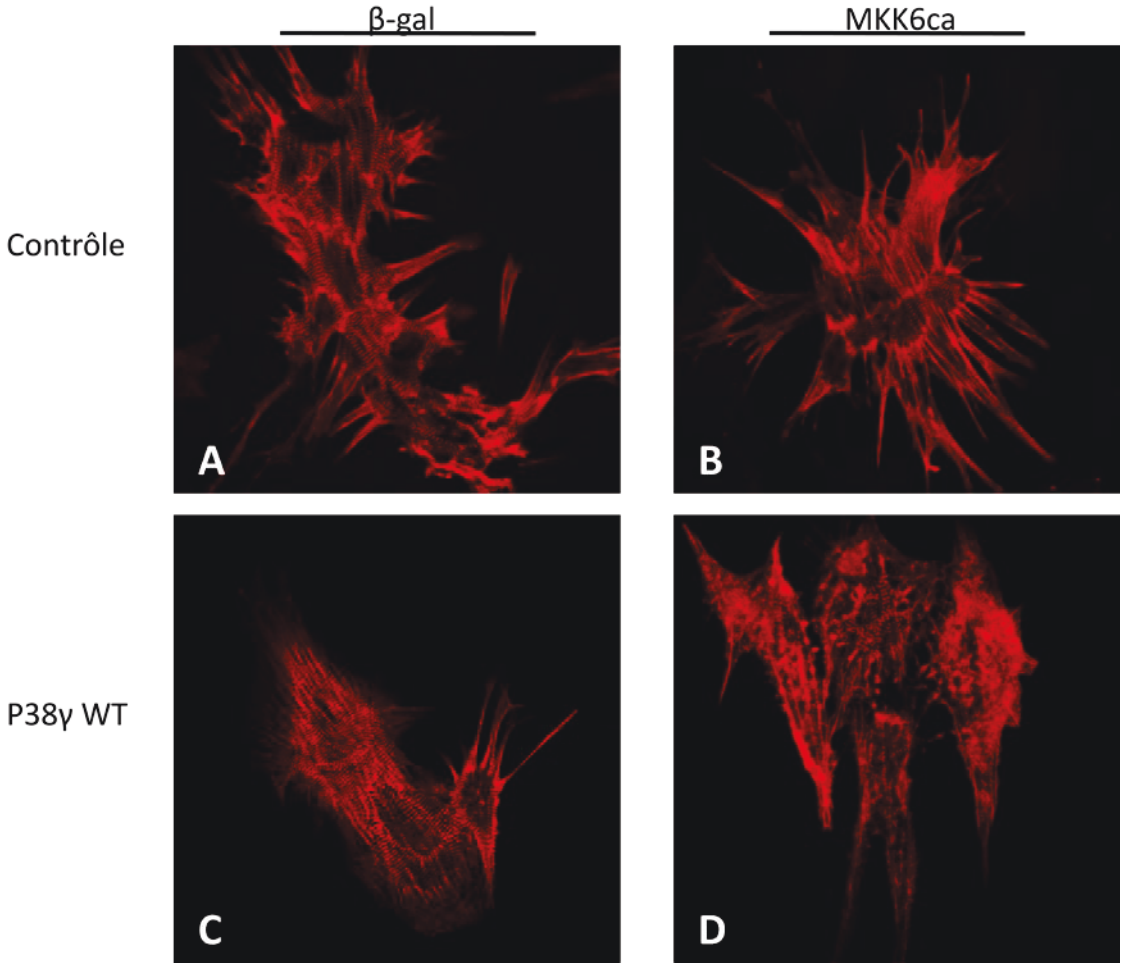
La localisation des mutants de p38 a été observée sur gel Phos-Tag suite à l'infection de l'adénovirus MKK6ca. Les résultats observés ont été reproduits (N=2)

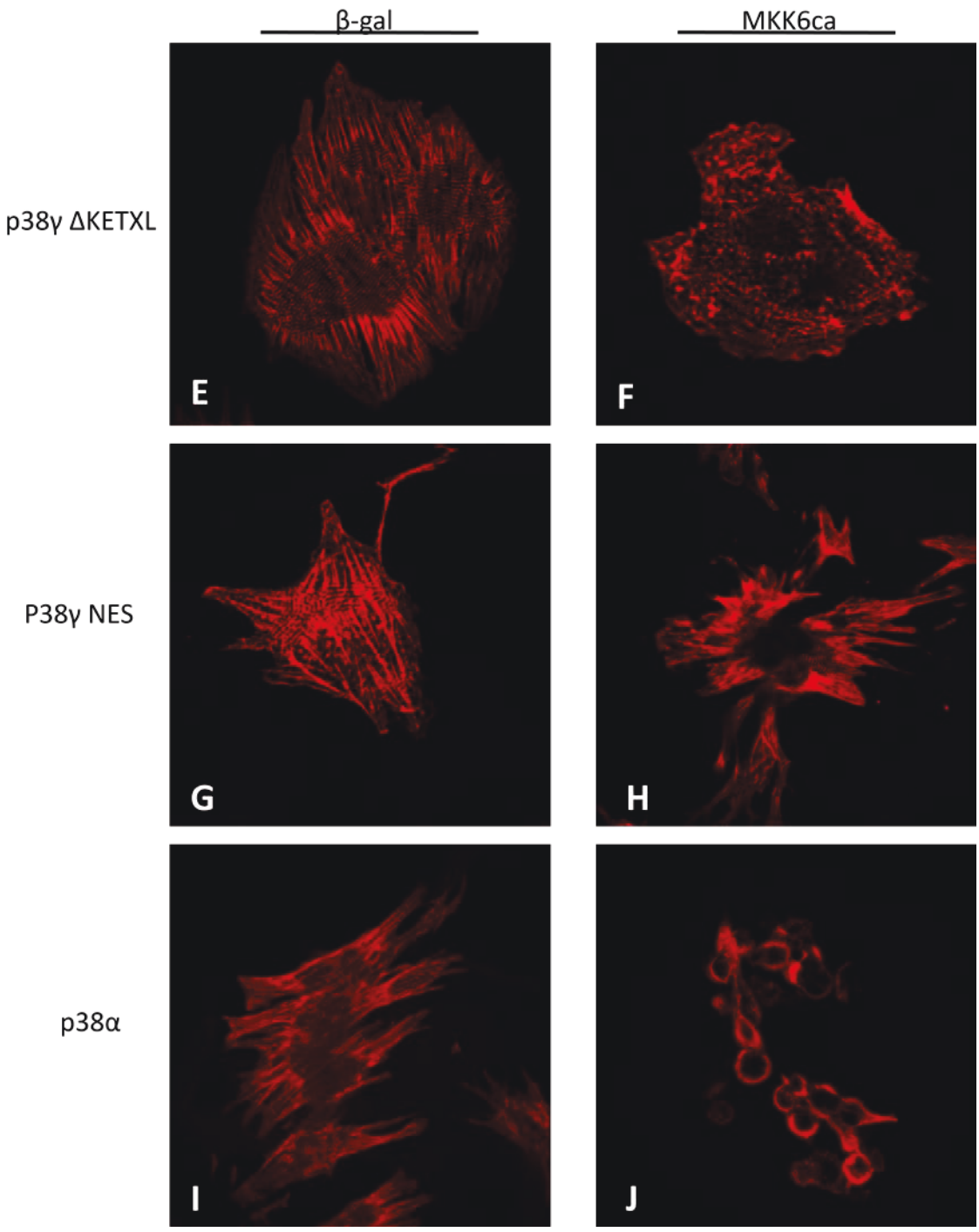
3.5 Effets de p38γ sur le réseau d'α-actinine des cardiomyocytes

Étant donné qu'il y a réorganisation des sarcomères en condition pathologique, l'influence de p38γ en présence ou non de MKK6ca sur l'organisation de l'α-actinine a été observée. La structure attendue des sarcomères retrouvée à la figure 3 montre une certaine linéarité des sarcomères sur plusieurs axes. Cette organisation est fortement dépendante du microenvironnement du cardiomyocyte et peut présenter une forte variation d'une cellule à l'autre (Bray et al., 2008).

L'adénovirus contrôle en présence de β-galactosidase montre plusieurs cardiomyocytes (figure 15A). La présence de sarcomères est observée sur différents axes, et la périphérie des cardiomyocytes démontrent également une présence plus prononcée d'α-actinine ne possédant pas une structure attendue d'un sarcomère. La micrographie de cardiomyocytes infectés avec l'adénovirus contrôle en présence de MKK6ca permet de discerner la présence des mêmes éléments, quoique les sarcomères sont moins abondants qu'en présence de β-galactosidase (figure 15B). La surexpression de p38γ de type sauvage montre une abondance de sarcomères. L'organisation de l'α-actinine est cependant différente en présence de MKK6ca et est davantage agglomérée. L'organisation des sarcomères est également peu évidente (figure 15C, D). Le mutant ΔKETXL exprimé en présence de β-galactosidase est similaire à la condition contrôle avec des sarcomères bien définis vers la région médiane des cardiomyocytes, et une plus grande abondance d'α-actinine vers la périphérie (figure 15E). L'α-actinine des cardiomyocytes dans lesquels sont surexprimés le mutant p38γ ΔKETXL et MKK6ca montre une organisation davantage ponctuelle sans permettre de distinguer les sarcomères (figure 15F). Les cardiomyocytes infectés par le mutant NES en présence de la β-galactosidase diffèrent de l'infection contrôle par la présence de bandes d'α-actinine plus large selon divers axes (figure 15G). Il y a présence de sarcomères visibles, mais ceux-ci sont relativement courts. Ce même mutant en présence de MKK6ca permet d'observer une accentuation de la présence de l'α-actinine en périphérie des cardiomyocytes. L'observation de la structure sarcomérique est toutefois difficile (figure 15H). La surexpression de p38α a une influence similaire aux constructions de p38γ de type sauvage ainsi que le mutant ΔKETXL sur l'organisation de l'α-actinine (figure 15I). La co-infection avec MKK6ca résulte cependant à un arrondissement des cardiomyocytes, morphologie attendue de la mort cellulaire causée

par cette MAPK (Figure 15J). Le mutant non phosphorylable présente une organisation de l'α-actinine similaire aux cardiomyocytes contrôle pour ses deux conditions (figure 15K, L). La construction additionnée d'un NES surexprimée avec la β-galactosidase montre chez certains cardiomyocytes une abondance de bandes larges d'α-actinine (figure 15M). Dans d'autres cardiomyocytes, le réseau sarcomérique peut être bien discerné. En présence de MKK6ca, l'organisation des sarcomères diffère du contrôle, et s'apparente davantage à des éléments ponctuels similaires au mutant ΔKETXL en présence de MKK6ca (figure 15N, F, respectivement). Il y a également présence accrue d'α-actinine en organisation autre que sarcomérique, plus près du centre du cardiomyocyte que retrouvé chez le contrôle.




β-gal
MKK6ca
p38γ ΔKETXL
P38γ NES
p38α
E
F
G
H
I
J

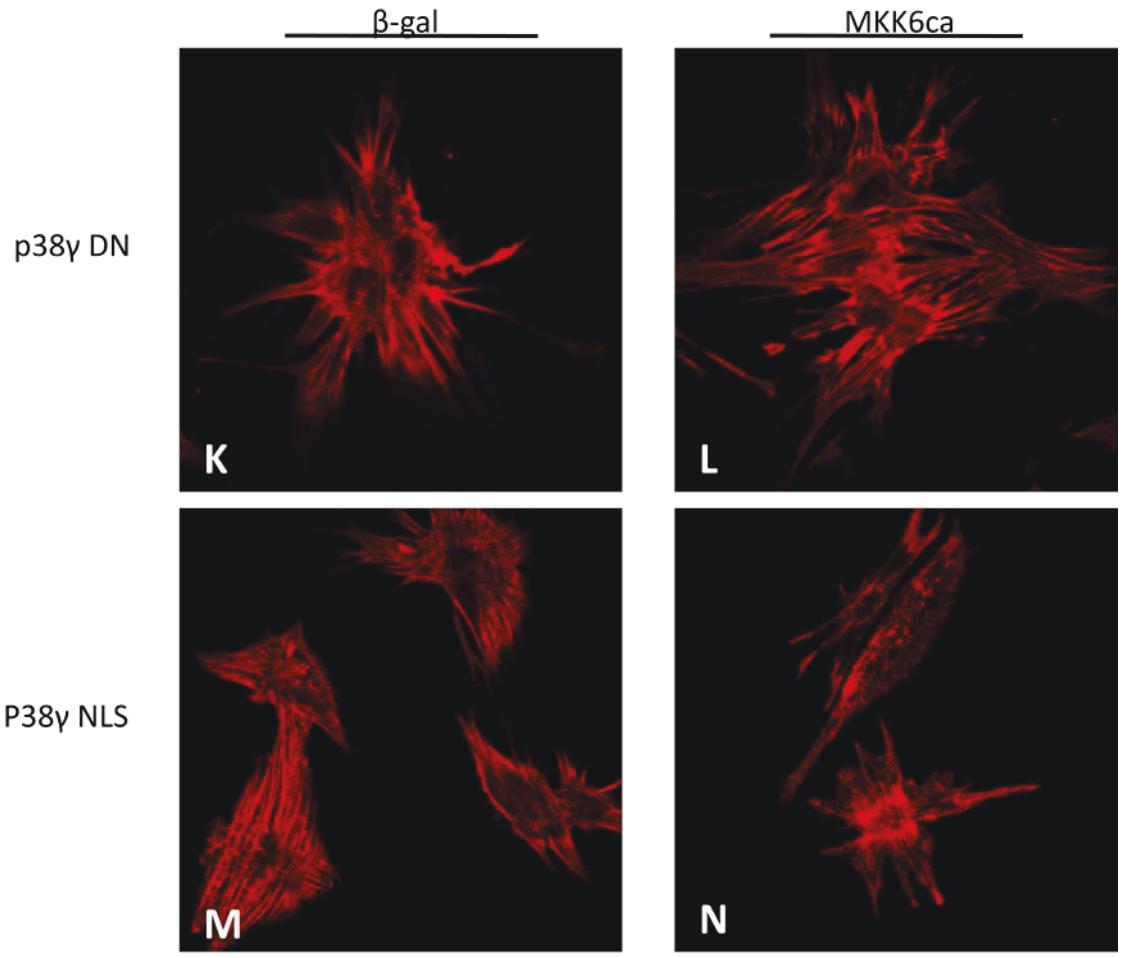


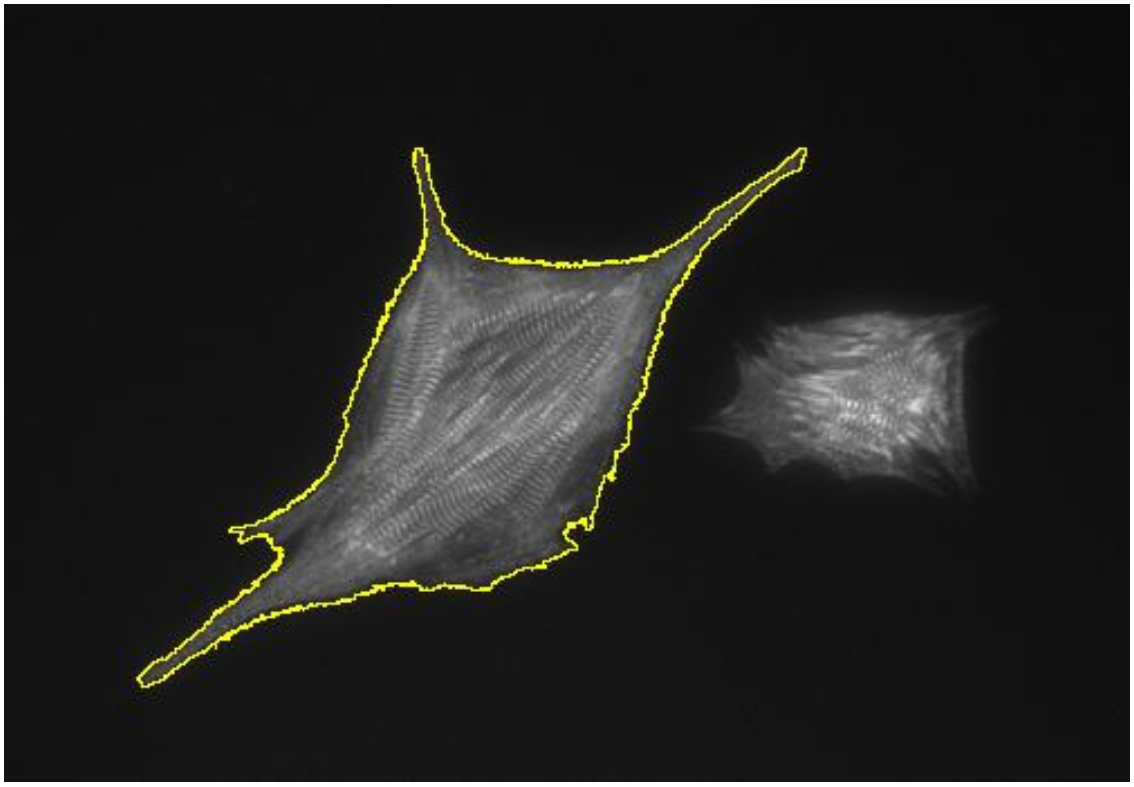
Figure 15 : Réseaux d'α-actinine des RNVC en présence des mutants p38

Des cardiomyocytes en culture ont été infectés par les différentes constructions de p38γ en présence ou non de l'activateur MKK6ca. Les réseaux d'actinine ont été ciblés avec des anticorps afin d'observer l'organisation sarcomérique des cardiomyocytes. A) Infection adénovirale contrôle avec expression de la β-gal. B) Infection contrôle avec expression de MKK6ca. C) Surexpression de p38γ de type sauvage en présence de la β-gal et D) en présence de MKK6ca. E) Surexpression du mutant p38γ ΔKETXL et de la β-gal ou F) de MKK6ca. G) Surexpression du mutant p38γ NES et de la β-gal ou H) de MKK6ca. I) Surexpression de p38α et de la β-gal ou J) de MKK6ca. K) Surexpression du mutant non phosphorylable de p38γ et de la β-gal ou L) de MKK6ca. M) Surexpression du mutant p38γ NLS et de la β-gal ou N) de MKK6ca. (β-gal = β-galactosidase).

3.6 Taille cellulaire des cardiomyocytes

Étant donné qu'une hypertrophie des cardiomyocytes peut être observée en condition pathologique, l'effet de la MAPK p38γ et des différents mutants sur la taille des RNVC a été étudié. Dix photos de cardiomyocytes en culture ont été prises de plaques à six puits pour chacun des mutants de p38 en présence de la β-galactosidase ou de mkk6ca ainsi qu'en présence ou non de sérum. La taille des cardiomyocytes a été évaluée à l'aide du programme ImageJ soit par sélection automatique en fonction du contraste de la cellule sur les photos, soit par délimitation manuelle du contour cellulaire (figure 16). Les tableaux 3 et 4 représentent de manière graphique les résultats d'analyse. Leurs barres d'erreur représentent l'erreur standard.

L'analyse de variance non paramétrique des données en présence de sérum ne note aucune différence statistiquement significative entre les diverses constructions et infections (Tableau 4). En contrepartie, l'ANOVA effectuée sur les cellules infectées en l'absence de sérum montre des différences de taille cellulaire tel qu'indiqué dans le tableau 4. p38α avec MKK6ca montre des tailles cellulaires inférieures à p38α avec la β-galactosidase ou MKK6ca seul. Également, p38γ en présence de MKK6ca montre des tailles cellulaires supérieures à p38α avec MKK6ca. Il n'y a pas de différence significative entre les différents mutants de p38γ non activés par MKK6ca. Au niveau des mutants de p38γ en présence de MKK6ca, les mutants ΔKETXL et NES montrent une hypertrophie des cellules comparativement à la β-galactosidase seulement.



<u>Figure 16</u> : Micrographie d'un cardiomyocyte infecté par un mutant p38

Des cardiomyocytes ont été infectés par les différents mutants de p38 en présence ou non de MKK6ca. Les cellules en pétri ont été ciblées et différenciées des fibroblastes avec des anticorps dirigés contre l'α-actinine (gris). La taille cellulaire a été mesurée par délimitation du contour des cardiomyocytes à l'aide du programme ImageJ (jaune). Cette micrographie et la délimitation du cardiomyocyte sont représentatives de l'expérience.

Tableau 3 : Taille cellulaire en fonction des infections en présence de sérum

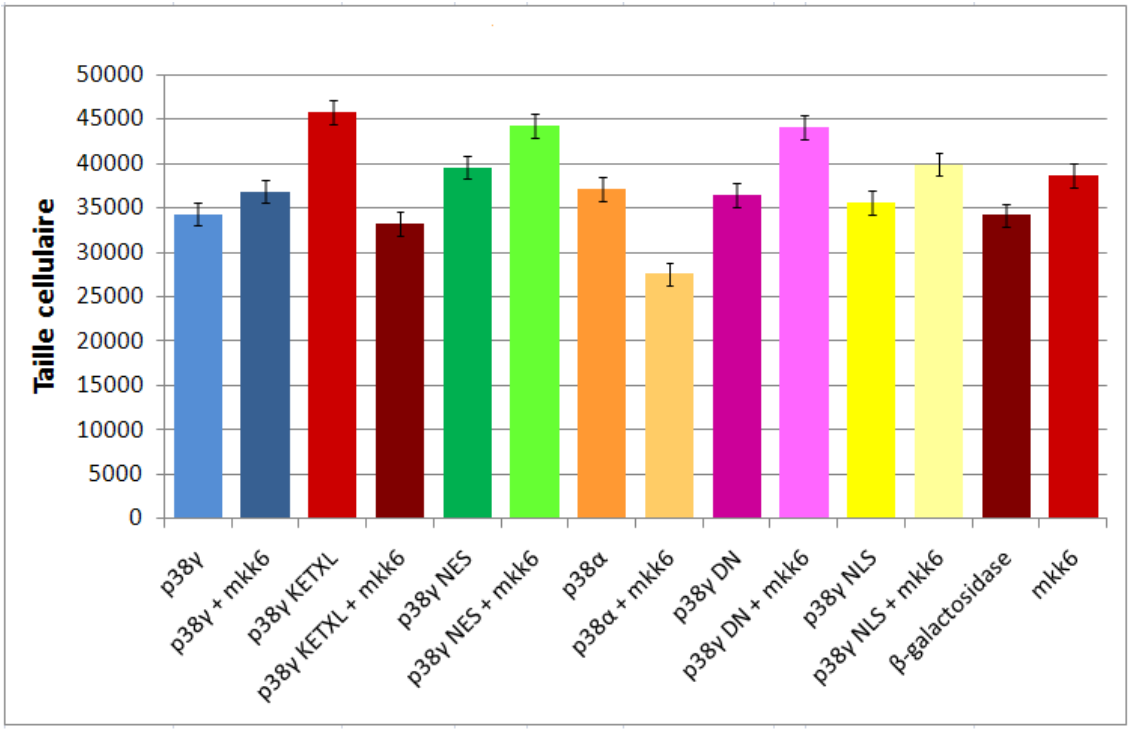
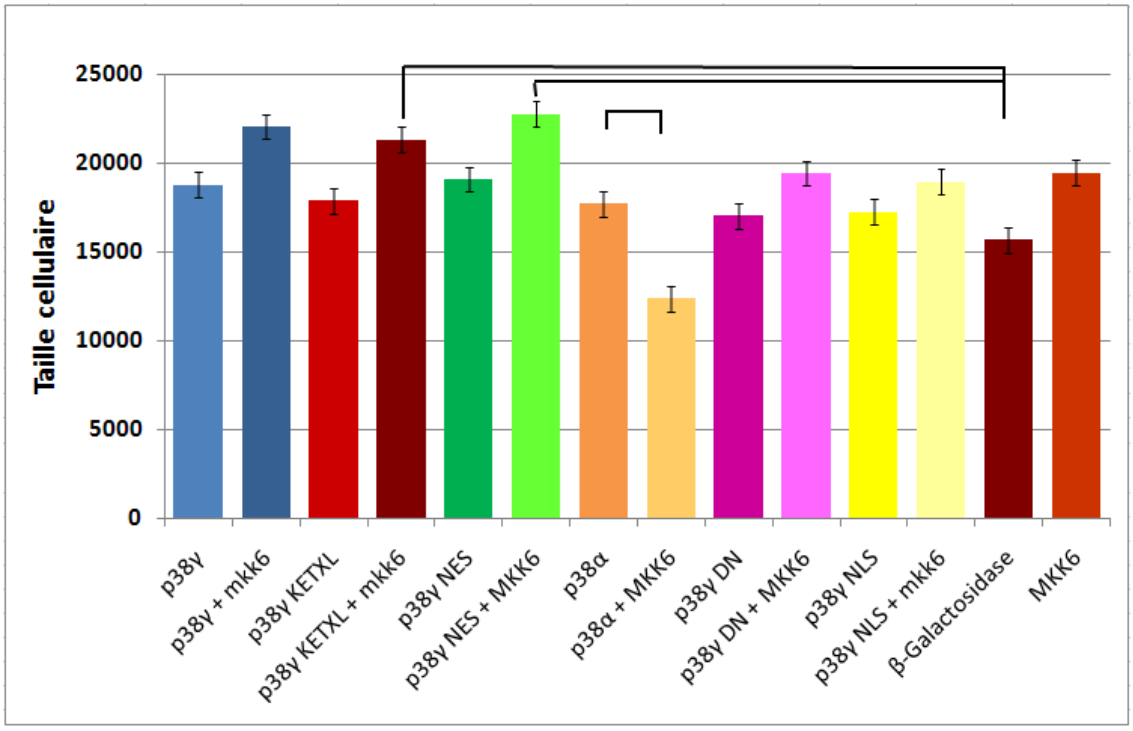


Tableau 4 : Taille cellulaire en fonction des infections en absence de sérum*



* : les barres représentent les résultats significativement différents à P <0.01

Discussion

L'objectif de l'étude est d'identifier le rôle joué par la MAPK p38γ dans la biologie des cardiomyocytes. Plus spécifiquement, l'influence de sa phosphorylation, de son motif de liaison KETXL et de sa localisation cellulaire sur la taille cellulaire et l'organisation des myofibrilles ont été observés.

4.1 Construction et activation des mutants adénoviraux

Plusieurs constructions ont été générées par mutagenèse d'addition ou de délétion. Dans tous les cas, leur suivi en immunofluorescence ou en immunobuvardage a été facilité par l'ajout de l'épitope FLAG en N-terminal. Breveté depuis 1987, cet épitope est très spécifique et permet l'observation des mutants sans signaux provenant de la protéine endogène. Également, la présence de cet épitope dans les études de phosphorylation sur gel d'acrylamide additionné de Phos-Tag éliminait le besoin d'utiliser des anticorps dirigés soit contre p38 phosphorylé ou non, soit contre les isoformes p38α ou p38γ.

Les études de localisation cellulaires impliquaient l'ajout de motifs NLS ou NES à la région N-terminale, après l'épitope FLAG et avant le domaine kinase (figure 6). Le motif NLS employé a été initialement identifié chez la nucléoplasmine et sa séquence est KRPAATKKAGQAKKKK (Robbins, Dilworth, Laskey, & Dingwall, 1991). Lorsque p38γ contenant le NLS est transfecté dans les COS7, son fonctionnement est sans équivoque (figure 8). Par contre, l'infection chez les cardiomycoytes de cette même protéine laisse voir une présence de cette dernière dans le cytoplasme sous forme d'amas ponctuels sans forcer la localisation au noyau (figure 12). Plusieurs explications sont possibles devant ce phénomène. La première identification en microscopie décrivait la localisation de p38γ comme étant ponctuelle et cytoplasmique chez les RNVC (Court et al., 2002). Également, le maintien de la p38γ au sarcoplasme des RNVC incubés en présence de leptomycine B, un inhibiteur d'export nucléaire de plusieurs protéines et ARNm, supporte le concept que cette kinase soit localisée principalement au sarcoplasme et non pas au noyau en condition basale (Seta & Sadoshima, 2002). Aussi, il a déjà été rapporté que certains NLS peuvent subir une phosphorylation qui module leur activité (Teng et al., 2011). Le motif NLS employé

contient une thréonine qui pourrait potentiellement être sujette à une phoshorylation. Cette hypothèse est appuyée par la présence d'un niveau de phosphorylation supérieur chez ce mutant même en l'absence de MKK6ca, mais d'une migration s'apparentant à une monophosphorylation plutôt qu'une diphosphorylation (figure 14). Les séquences ou interactions requises chez p38γ pour le maintien de cette translocation au cytoplasme ne semblent pas connues encore à ce jour, mais risquent peu d'impliquer le motif KETXL en C-terminal car celui-ci maintient une présence cytoplasmique (figures 8 et 12). L'implication première de la translocation voulue au noyau de manière exclusive aurait éliminé toute interaction possible avec les substrats en aval de p38γ au cytoplasme. D'autres alternatives de maintien au noyau seraient à envisager, comme l'usage d'une autre séquence NLS existante.

Le motif NES quant à lui, dont la séquence est LALKLAGLDI, provient de l'inhibiteur de protéine kinase alpha cAMP-dépendant (IPKA) humain et exerce sa fonction normale d'export forcé du noyau vers le cytoplasme à la fois chez les COS7 transfectées et les cardiomyocytes infectés (figures 8 et 12). La présence de ce motif permet efficacement de restreindre les interactions possibles de p38γ avec ses substrats ou effecteurs potentiels qui seraient retrouvés au noyau.

Étant donné que le modèle cellulaire à l'étude est une culture primaire de cardiomyocytes, les expérimentations effectuées nécessitaient la génération de virus encodant les différents mutants générés. En effet, la transfection de plasmides dans les cardiomyocytes par l'intermédiaire d'agents de transfection s'élève à 8% chez les RNVC en culture (Djurovic, Iversen, Jeansson, Hoover, & Christensen, 2004). La méthode de prédilection a été la génération d'adénovirus, compte tenu de la facilité de production et de maintien de stock de ceux-ci par l'intermédiaire des HEK293A. Son efficacité d'infection des cardiomyocytes s'élève à près de 90% des cellules en culture et ne montre pas de toxicité due à l'infection (Djurovic et al., 2004).

Les différents mutants ont été surexprimés en présence de trois activateurs différents, soit MKK6ca, l'anisomycine et le sorbitol (figure 13). Parmi ces trois activateurs, MKK6 s'avère le plus efficace. Les résultats obtenus du niveau d'activation supérieur

par le sorbitol plutôt que de l'anisomycine concordent avec la littérature, mais d'autres activateurs de p38γ auraient pu être évalués, comme l'exposition des cellules aux UV, un choc osmotique, ou même MKK3 (Remy et al., 2010). L'approche d'activation des p38 à l'aide d'un activateur en amont implique l'activation de voies non étudiées ou non désirées. Par exemple, MKK6 active les autres p38, et peut interagir avec d'autres protéines, dont ASK1 ou l'ubiquitine ligase pVHL (Pearson et al., 2001; Sturchler, Feurstein, McDonald, & Duckett, 2010; M. Teng et al., 2012). Une approche alternative serait l'usage de mutants constitutivement actif de p38. Leur niveau d'activation est cependant inférieur à la protéine native, mais elles ne nécessitent aucun élément externe pour les activer et permettent d'étudier leurs fonctions sans activer une panoplie de voies métaboliques non souhaitées (Askari et al., 2007; Avitzour et al., 2007; Diskin, Askari, Capone, Engelberg, & Livnah, 2004). La différence d'approche sur l'activation de p38γ peut influencer grandement les résultats observés par les activations de processus cellulaires non désirés et devrait être utilisée en fonction des paramètres cellulaires à l'étude.

En ce qui concerne la phosphorylation des différents mutants de p38 avec MKK6ca, tel qu'attendu, le mutant non phosphorylable de p38γ est le seul qui ne présente pas de signe de phosphorylation sur gel d'acrylamide additionné de Phos-Tag. La substitution des Thr183 et Tyr185 du motif d'activation de p38γ par deux alanines enlève effectivement toute possibilité d'activation de p38γ par MKK6ca. Les autres mutants montrent en effet de la phosphorylation en présence de MKK6ca à l'exception du mutant non phosphorylable, tel qu'attendu (figure 14). Également, p38α ne semble pas montrer de phosphorylation même en présence de MKK6ca. Cela pourrait être expliqué par la nature pro-apoptotique de cette MAPK, qui ne laisse place qu'à la récolte des cardiomyocytes n'ayant pas subi l'effet de cette kinase phosphorylée (Y. Wang, 1998). La phosphorylation du mutant NLS de p38γ demeure cependant un cas intéressant. Il présente un niveau de phosphorylation équivalent à la protéine non phosphorylée même en l'absence d'activateur. Cela suggère qu'une augmentation de la localisation au noyau, même partiellement efficace, entraîne une phosphorylation basale accrue de p38γ. Une autre suggestion soulevée précédemment serait la possibilité de phosphorylation du motif NLS lui-même.

4.2 Altération des réseaux d'α-actinine

Le réseau d'α-actinine des cardiomyocytes a été observé suite à l'infection des différents mutants de p38γ. L'α-actinine est une composante des myofibrilles et peut être employé comme marqueur de son organisation. La structure attendue des sarcomères chez les RNVC peut varier en quantité et en longueur d'une cardiomyocyte à l'autre, mais leur arrangement de lignes Z délimitant les sarcomères demeure semblable (figure 3). Ce réseau demeure intact lorsque les RNVC surexpriment la β-galactosidase seule (figure 15A). Il en est de même pour la surexpression individuelle de MKK6ca (figure 15B). La surexpression de p38γ de type sauvage en présence de la β-galactosidase, ainsi que les mutants ΔKETXL et non phosphorylable dans la même condition montrent un arrangement de l'α-actinine semblable au contrôle (Figure 15C, E et K) Cela suggère que, au niveau basal, la protéine p38 n'influence pas de manière observable les réseaux d'α-actinine des cardiomyocytes. Cela concorde avec la littérature, qui avait déjà montré que la surexpression de p38γ n'influençait pas la morphologie cellulaire (Court et al., 2002). En contrepartie, les mutants de localisation cellulaire NES et NLS coexprimés avec la β-galactosidase montrent des bandes plus larges d'α-actinine, et les réseaux sarcomériques retrouvés au contrôle semblent moins distincts et plus courts (figure 15G et M). Cette observation supporte l'idée que la relocalisation cellulaire de p38γ notée en condition de stress pathologique aurait un impact sur le cardiomyocyte et sa structure (Dingar et al., 2010)

Les réseaux d'α-actinine sont altérés lorsque les MAPK p38 sont surexprimées en combinaison avec MKK6ca. p38α montre une mort cellulaire, ce qui explique les réseaux circulaires observés (figure 15J). Ce phénomène est normal, car cette isoforme est connue comme étant délétère à la survie des cardiomyocytes (Y. Wang, 1998). Les réseaux semblent s'agglutiner pour p38γ de type sauvage. Il en est de même pour les mutants de localisation cellulaire NES et NLS (figure 15D, H et N). Dans le cas du mutant tronqué du motif KETAL, l'α-actinine devient ponctuelle (figure 15F). Seul le mutant non phosphorylable de p38γ maintient l'intégrité de l'α-actinine (figure 15L). Cela suggère que p38γ phosphorylé et actif contribuerait à la désorganisation des réseaux d'α-actinine, sans égard à la présence de son motif KETAL. De plus, compte tenu que le mutant NLS est davantage phosphorylé même sans MKK6ca et que ce

mutant ne cause pas de désorganisation à lui seul, il est plausible de suggérer que la localisation de p38γ induit cette désorganisation également en fonction de sa localisation au cytoplasme. Cette suggestion est basée sur l'hypothèse que le motif NLS n'est pas lui-même phosphorylé.

4.3 Altération de taille cellulaire

La taille cellulaire moyenne en fonction des différentes constructions a également été mesurée. Il est déjà connu que p38γ influence le maintien de la taille cellulaire chez le muscle squelettique et est impliqué dans les processus de régénération des myofibres en phosphorylant MyoD (Foster et al., 2012; Gillespie et al., 2009; Kukkonen-Macchi et al., 2011). En présence de sérum, les différents mutants de p38 n'induisent pas de changements de taille significativement importants (tableau 5). Certaines variations, notamment la diminution de taille cellulaire lorsque p38γ ΔKETXL est co-infecté avec MKK6ca, peuvent également être corroborées avec les micrographies révélant l'α-actinine (figure 15E, F). Les autres variations sont de faible envergure est ne peuvent être rapportées fidèlement aux micrographies de microscopie confocale, car l'amplitude des variations de taille des cradiomyocytes est élevée et résulte à la fois de la qualité de la culture primaire et du microenvironnement de ces cellules (Bray et al., 2008). Cependant, en l'absence de sérum, plusieurs différences statistiques sont observées. Cette différence de milieu de culture est importante, car l'activation de p38 est généralement peu affectée par le sérum (Cuenda & Rousseau, 2007). En concordance avec la mort cellulaire observée à la figure 15J, p38α en présence de MKK6ca montre une diminution de la taille des cardiomyocytes. Cette observation pose un contraste entre l'effet de p38α et p38γ sur la taille et, indirectement, sur la survie des cardiomyocytes. Bien que cette opposition d'action entre les deux isoformes demeure encore débattue dans la littérature, cette observation renforce ce concept déjà documenté (Askari et al., 2007; Nishida et al., 2004; Qi et al., 2007; Y. Wang, 1998)

La protéine p38γ et ses différents mutants présentent un cas intéressant. D'abord, la protéine p38γ avec la β-galactosidase comparée à l'infection n'ayant que la β-galactosidase ne montre aucun signe de changement de taille, ce qui suggère que p38γ n'a pas d'effets sur la taille au niveau basal. Les différents mutants en présence de β-galactosidase ne présentent pas de différence statistique par rapport à p38γ de type

sauvage, ce qui suggère qu'aucun élément modifié par chacun des mutants ne constitue un élément régulateur de taille cellulaire de manière basale (tableau 4). Cependant, les différents mutants de p38γ en présence de MKK6ca dénotent une différence de taille statistique dans certains cas, mais également des tendances non statistiques. De manière statistique, le mutant NES en présence de MKK6ca génère une hypertrophie des cellules par rapport au contrôle de la β-galactosidase. Cette observation n'est cependant pas marquée en contraste avec le contrôle de MKK6ca seul, ce qui suggère que la concomitance de p38γ hors du noyau et de son activateur direct en amont est requise pour générer une hypertrophie des cardiomyocytes. En contraste, le mutant NLS en présence de MKK6ca ne génère pas d'hypertrophie. Cette notion est intéressante car, dans une situation de pathologie cardiaque, p38γ est davantage transloqué vers le noyau (Dingar et al., 2010). Un autre mutant génère également une hypertrophie en présence de MKK6ca : le mutant ΔKETAL. Il est déjà connu que la présence de p38γ est requise pour le maintien normal des muscles squelettiques et leur différenciation. Le phénomène observé chez les cardiomyocytes semble contraire, car la perturbation de p38γ par l'usage de mutants engendre une hypertrophie plutôt qu'une atrophie (Foster et al., 2012; Gillespie et al., 2009). L'hypertrophie observée chez le mutant KETAL peut être expliquée par une perte d'interaction avec d'autres protéines. Par exemple, p38γ peut normalement lier certaines protéines structurales avec ce motif, comme hDlg ou α1-syntrophine (Hasegawa et al., 1999; Sabio et al., 2010). La perte possible de cette interaction pourrait expliquer en partie l'hypertrophie observée, sans toutefois en élucider le mécanisme.

Les résultats de taille cellulaire montrent également une tendance, bien qu'elle ne soit pas nécessairement statistique. En comparaison avec le contrôle MKK6ca, les mutants de type sauvage, NES et KETAL montrent une taille cellulaire moyenne supérieure. En contrepartie, les mutants NLS et DN semblent engendrer des tailles cellulaires équivalentes au contrôle MKK6ca. Cet élément hypertrophique pourrait être lié au niveau de phosphorylation. En effet, ces deux mutants présentaient des niveaux de phosphorylation nettement inférieurs aux trois autres mutants en présence de leur activateur (figure 14). Il serait plausible d'avancer que la phosphorylation de p38γ, plus que la localisation et le motif KETAL, pourrait avoir un rôle davantage important dans l'apparition du phénotype d'hypertrophie des cardiomyocytes. En définitive, il est probable que p38γ ait bel et bien une influence sur l'hypertrophie des cardiomyocytes,

bien que cette influence soit dépendante d'autres facteurs et de MKK6 pour être significative.

Conclusions et perspectives

Le but de l'étude était de déterminer le rôle de p38γ chez les cardiomyocytes. Les réseaux d'actinine et la taille cellulaire ont été observés. Selon les résultats obtenus, p38γ aurait des rôles différents en fonction de son activation par phosphorylation, ses partenaires d'interaction par son motif de liaison aux domaines PDZ, et sa localisation cellulaire. Sa phosphorylation aurait pour effet la désorganisation des réseaux d'α-actinine, tandis que son motif KETAL et sa localisation forcée au cytoplasme seraient des éléments régulateurs de l'hypertrophie cardiaque.

Ces expérimentations ne fournissent qu'une piste quant aux rôles possibles de p38γ chez les cardiomyocytes. Plusieurs autres expérimentations pourraient renforcer les concepts explorés jusqu'à maintenant ainsi qu'explorer de nouvelles voies.

Ici, les expérimentations ont été effectuées en surexprimant p38γ. Une approche par suppression de la protéine par siRNA ou par knock-out permettrait de confirmer les résultats déjà obtenus. Cette approche serait d'autant plus intéressante que la littérature ne lui accorde qu'une importance au niveau de la mitose chez les HeLa jusqu'à maintenant (Kukkonen-Macchi et al., 2011).

Le mutant de localisation au noyau n'était pas entièrement efficace. Plusieurs autres NLS sont répertoriés (Nair, 2003). Leur longueur varie et, très possiblement, leur taux d'efficacité également. Il serait intéressant de générer différents mutants NLS afin d'optimiser ce mutant.

Le sarcomère est l'unité basale des myofibrilles et est impliqué dans la contractilité de ces cellules. Étant donné que la MAPK p38γ phosphorylée semble être impliquée dans l'organisation de l'α-actinine, une sous-unité du sarcomère, il est également possible que p38γ ait une influence au moins indirecte sur la contractilité, par sa liaison à hDlg, à titre d'exemple, impliquée dans les complexes de dystrophine musculaire (Petitprez et

al., 2011). La contractilité est altérée en conditon ischémique pour p38α et p38β, et des souris transgéniques codant un mutant non phosphorylable de p38α ne renversent pas cette condition (Cross, 2011; Yibin Wang, 2007). Toujours dans une perspective de dualité d'action des isoformes des p38, il se pourrait que p38γ y ait un rôle davantage important (Cross, 2011).

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier docteur Dave Boucher, collègue et ami, pour les nombreuses discussions sur les MAPK, l'approche expérimentale et la science en général. À ces mêmes égards, je voudrais remercier madame Véronique Blais, assistante de recherche du laboratoire du professeur Jean-Bernard Denault. J'ai pu bénéficier de son expertise sur les expérimentations en général et de son vaste savoir sur les ressources matérielles, technologiques et bibliographiques.

J'aimerais également remercier mes deux mentors, les Pr. Michel Grandbois et Guylain Boissonneault, qui ont su apporter une perspective élargie ainsi que de précieux conseils pour la complétion de mon projet.

J'aimerais remercier grandement Heidi Larkin et Élie Simard, étudiants au doctorat des laboratoires des Pr. Christine Lavoie et Michel Grandbois. Sans leur patience et leur savoir-faire inépuisable, je n'aurais pu effectuer correctement les expérimentations de microscopie confocale et à épifluorescence.

J'en profite pour remercier nos valeureux stagiaires du baccalauréat, messieurs Jean-Guillaume Bastien et Hugo Giguère, qui ont contribué au développement et au maintien du laboratoire depuis ses débuts, et qui auront le privilège de prendre le flambeau.

Enfin, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Pr. Mannix Auger-Messier, sans qui toute cette aventure n'aurait jamais eu lieu.

Merci à vous tous.

Liste des références

Ambrosino, C., Mace, G., Galban, S., Fritsch, C., Vintersten, K., Black, E., … Gorospe, M. (2003). Negative Feedback Regulation of MKK6 mRNA Stability by p38 α Mitogen-Activated Protein Kinase Negative Feedback Regulation of MKK6 mRNA Stability by p38 α Mitogen-Activated Protein Kinase. *Society*. doi:10.1128/MCB.23.1.370

Askari, N., Diskin, R., Avitzour, M., Capone, R., Livnah, O., & Engelberg, D. (2007). Hyperactive Variants of p38 α Induce , whereas Suppress , Activating Protein 1-mediated Transcription *. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(1), 91–99. doi:10.1074/jbc.M608012200

Avitzour, M., Diskin, R., Raboy, B., Askari, N., Engelberg, D., & Livnah, O. (2007). Intrinsically active variants of all human p38 isoforms. *The FEBS journal*, *274*(4), 963–75. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05644.x

Boyden, P. a, Hirose, M., & Dun, W. (2010). Cardiac Purkinje cells. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*, *7*(1), 127–35. doi:10.1016/j.hrthm.2009.09.017

Bray, M.-A., Sheehy, S. P., & Parker, K. K. (2008). Sarcomere alignment is regulated by myocyte shape. *Cell motility and the cytoskeleton*, *65*(8), 641–51. doi:10.1002/cm.20290

Burnette, B. L., Selness, S., Devraj, R., Jungbluth, G., Kurumbail, R., Stillwell, L., … Monahan, J. (2009). SD0006: a potent, selective and orally available inhibitor of p38 kinase. *Pharmacology*, *84*(1), 42–60. doi:10.1159/000227286

Cannavo, A., Liccardo, D., & Koch, W. J. (2013). Targeting cardiac β-adrenergic signaling via GRK2 inhibition for heart failure therapy. *Frontiers in physiology*, *4*(September), 264. doi:10.3389/fphys.2013.00264

Cohen, P. (1997). The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends in Cell biology*, *8924*(97), 353–361.

Court, N. W., dos Remedios, C. G., Cordell, J., & Bogoyevitch, M. a. (2002). Cardiac expression and subcellular localization of the p38 mitogen-activated protein kinase member, stress-activated protein kinase-3 (SAPK3). *Journal of molecular and cellular cardiology*, *34*(4), 413–26. doi:10.1006/jmcc.2001.1523

Cross, H. (2011). Effect of p38 MAP Kinases on Contractility and Ischemic Injury in Intact Heart, *96*(3), 307–323. doi:10.1556/APhysiol.96.2009.3.5.Effect

Cuenda, A., & Rousseau, S. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et biophysica acta*, *1773*(8), 1358–75. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.03.010

Cuevas, B. D., Abell, a N., & Johnson, G. L. (2007). Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. *Oncogene*, *26*(22), 3159–71. doi:10.1038/sj.onc.1210409

Dingar, D., Merlen, C., Grandy, S., Gillis, M.-A., Villeneuve, L. R., Mamarbachi, A. M., … Allen, B. G. (2010). Effect of pressure overload-induced hypertrophy on the expression and localization of p38 MAP kinase isoforms in the mouse heart. *Cellular signalling*, *22*(11), 1634–44. doi:10.1016/j.cellsig.2010.06.002

Diskin, R., Askari, N., Capone, R., Engelberg, D., & Livnah, O. (2004). Active Mutants of the Human p38 [illegible] Mitogen-activated Protein Kinase *. *Biochemistry*, *279*(45), 47040–47049. doi:10.1074/jbc.M404595200

Djurovic, S., Iversen, N., Jeansson, S., Hoover, F., & Christensen, G. (2004). Comparison of nonviral transfection and adeno-associated viral transduction on cardiomyocytes. *Molecular biotechnology*, *28*(1), 21–32. doi:10.1385/MB:28:1:21

Enslen, H., Brancho, D. M., & Davis, R. J. (2000). Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *The EMBO journal*, *19*(6), 1301–11. doi:10.1093/emboj/19.6.1301

Enslen, H., Raingeaud, J., & Davis, R. J. (1998). Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *The Journal of biological chemistry*, *273*(3), 1741–8. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9430721

FMC. (2013). Statistiques. *Statistiques*. Retrieved December 06, 2013, from http://www.fmcoeur.qc.ca/site/c.kpIQKVOxFoG/b.3669917/k.9F47/Statistiques.htm

Foster, W. H., Tidball, J. G., & Wang, Y. (2012). P38Γ Activity Is Required for Maintenance of Slow Skeletal Muscle Size. *Muscle & nerve*, *45*(2), 266–73. doi:10.1002/mus.22289

Gillespie, M. a, Le Grand, F., Scimè, A., Kuang, S., von Maltzahn, J., Seale, V., … Rudnicki, M. a. (2009). P38-{Gamma}-Dependent Gene Silencing Restricts Entry Into the Myogenic Differentiation Program. *The Journal of cell biology*, *187*(7), 991–1005. doi:10.1083/jcb.200907037

Guénard, H. (2009). *Physiologie Humaine*. (H. Guénard, Ed.) (p. 607). Rueil-Malmaison Cedex: Pradel.

Haddad, G. G., & Lister, G. (1996). *Tissue Oxygen Deprivation*. (C. Lenfant, Ed.) (Vol. 95., p. 1085). New York, NY: Marcel Dekker, Inc.

Haeusgen, W., Herdegen, T., & Waetzig, V. (2011). The bottleneck of JNK signaling: molecular and functional characteristics of MKK4 and MKK7. *European journal of cell biology*, *90*(6-7), 536–44. doi:10.1016/j.ejcb.2010.11.008

Hasegawa, M., Cuenda, A., Grazia, M., Thomas, G. M., Cohen, P., & Goedert, M. (1999). Stress-activated Protein Kinase-3 Interacts with the PDZ Domain of Syntrophin, *274*(18), 12626–12631.

Huang, C.-Y., & Tan, T.-H. (2012). DUSPs, to MAP kinases and beyond. *Cell & bioscience*, *2*(1), 24. doi:10.1186/2045-3701-2-24

Irisawa, H., Brown, H. F., & Giles, W. (1993). Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiological reviews*, *73*(1), 197–227. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8380502

Jeffrey, K. L., Camps, M., Rommel, C., & Mackay, C. R. (2007). Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nature reviews. Drug discovery*, *6*(5), 391–403. doi:10.1038/nrd2289

Johnson, G. L., Dohlman, H. G., & Graves, L. M. (2005). MAPK kinase kinases (MKKKs) as a target class for small-molecule inhibition to modulate signaling networks and gene expression. *Current opinion in chemical biology*, *9*(3), 325–31. doi:10.1016/j.cbpa.2005.04.004

Katz, A. M. (2006). *Physiology of the Heart*. (L. W. & W. Wilkins, Ed.) (Fourth Edi., p. 644). Philadelphia, PA.

Keesler, G. A., Bray, J., Hunt, J., Johnson, D. A., Gleason, T., Yao, Z., … Lichenstein, H. S. (1998). Purification and Activation of Recombinant p38, *228*, 221–228.

Klabunde, R. E. (2011). *Cardiovascular Physiology Concepts*. (R. E. Klabunde, Ed.) (Second Edi., p. 243). Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins.

Kukkonen-Macchi, A., Sicora, O., Kaczynska, K., Oetken-Lindholm, C., Pouwels, J., Laine, L., & Kallio, M. J. (2011). Loss of p38gamma MAPK induces pleiotropic mitotic defects and massive cell death. *Journal of cell science*, *124*(Pt 2), 216–27. doi:10.1242/jcs.068254

Kuma, Y., Sabio, G., Bain, J., Shpiro, N., Márquez, R., & Cuenda, A. (2005). BIRB796 inhibits all p38 MAPK isoforms in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry*, *280*(20), 19472–9. doi:10.1074/jbc.M414221200

Lilly, L. S. (2011). *Pathophysiology of Heart Disease*. (L. S. Lilly, Ed.) (Fifth Edit., p. 461). Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins.

Longo, D. L. (2012). *Harrison's Principle of Internal Medicine*. (D. L. Longo, A. S. Fauci, D. L. Kasper, S. L. Hauser, J. L. Jameson, & J. Loscalzo, Eds.) (18th Editi.). New York, NY: McGraw-Hill.

Lukas, S. M., Kroe, R. R., Wildeson, J., Peet, G. W., Frego, L., Davidson, W., … Werneburg, B. G. (2004). Catalysis and Function of the p38R , MK2a Signaling Complex, *1992*, 9950–9960.

Maisel, A. S., & Choudhary, R. (2012). Biomarkers in acute heart failure-state of the art. *Nature reviews. Cardiology*, *9*(8), 478–490. doi:10.1038/nrcardio.2012.60

Moore, S. (2013). 'Round-the-horn site-directed mutagenesis. Retrieved December 06, 2013, from http://openwetware.org/wiki/'Round-the-horn_site-directed_mutagenesis

Muslin, A. J. (2005). Role of raf proteins in cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival. *Trends in cardiovascular medicine*, *15*(6), 225–9. doi:10.1016/j.tcm.2005.06.008

Nair, R. (2003). NLSdb: database of nuclear localization signals. *Nucleic Acids Research*, *31*(1), 397–399. doi:10.1093/nar/gkg001

Nishida, K., Yamaguchi, O., Hirotani, S., Hikoso, S., Higuchi, Y., Watanabe, T., … Hori, M. (2004). p38 α Mitogen-Activated Protein Kinase Plays a Critical Role in Cardiomyocyte Survival but Not in Cardiac Hypertrophic Growth in Response to Pressure Overload p38 -Activated Protein Kinase Plays a Critical Role in Cardiomyocyte Survival but Not i. doi:10.1128/MCB.24.24.10611

Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., & Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews*, *22*(2), 153–83. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11294822

Petitprez, S., Zmoos, A.-F., Ogrodnik, J., Balse, E., Raad, N., El-Haou, S., … Abriel, H. (2011). SAP97 and dystrophin macromolecular complexes determine two pools of cardiac sodium channels Nav1.5 in cardiomyocytes. *Circulation research*, *108*(3), 294–304. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.228312

Qi, X., Pohl, N. M., Loesch, M., Hou, S., Li, R., Qin, J.-Z., … Chen, G. (2007). p38alpha antagonizes p38gamma activity through c-Jun-dependent ubiquitin-proteasome pathways in regulating Ras transformation and stress response. *The Journal of biological chemistry*, *282*(43), 31398–408. doi:10.1074/jbc.M703857200

Remy, G., Risco, A. M., Iñesta-Vaquera, F. a, González-Terán, B., Sabio, G., Davis, R. J., & Cuenda, A. (2010). Differential activation of p38MAPK isoforms by MKK6 and MKK3. *Cellular signalling*, *22*(4), 660–7. doi:10.1016/j.cellsig.2009.11.020

Risco, A., & Cuenda, A. (2012). New Insights into the p38γ and p38δ MAPK Pathways. *Journal of signal transduction*, *2012*, 520289. doi:10.1155/2012/520289

Risco, A., Del Fresno, C., Mambol, A., Alsina-Beauchamp, D., Mackenzie, K. F., Yang, H.-T., … Cuenda, A. (2012). p38γ and p38δ kinases regulate the Toll-like receptor 4 (TLR4)-induced cytokine production by controlling ERK1/2 protein kinase pathway activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *4*, 1–6. doi:10.1073/pnas.1207290109

Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. a, & Dingwall, C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, *64*(3), 615–23. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1991323

Rosenthal, D. T., Iyer, H., Escudero, S., Bao, L., Wu, Z., Ventura, A. C., … Merajver, S. D. (2011). p38γ promotes breast cancer cell motility and metastasis through regulation of RhoC GTPase, cytoskeletal architecture, and a novel leading edge behavior. *Cancer research*, *71*(20), 6338–49. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1291

Sabio, G., Arthur, J. S. C., Kuma, Y., Peggie, M., Carr, J., Murray-Tait, V., … Cuenda, A. (2005). p38gamma regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP. *The EMBO journal*, *24*(6), 1134–45. doi:10.1038/sj.emboj.7600578

Sabio, G., Cerezo-Guisado, M. I., Del Reino, P., Iñesta-Vaquera, F. a, Rousseau, S., Arthur, J. S. C., … Cuenda, A. (2010). p38gamma regulates interaction of nuclear PSF and RNA with the tumour-suppressor hDlg in response to osmotic shock. *Journal of cell science*, *123*(Pt 15), 2596–604. doi:10.1242/jcs.066514

Seta, K., & Sadoshima, J. (2002). What is the unique function of SAPK3/p38gamma in cardiac myocytes? *Journal of molecular and cellular cardiology*, *34*(6), 597–600. doi:10.1006/jmcc.2002.2000

Sturchler, E., Feurstein, D., McDonald, P., & Duckett, D. (2010). Mechanism of oxidative stress-induced ASK1-catalyzed MKK6 phosphorylation. *Biochemistry*, *49*(19), 4094–102. doi:10.1021/bi100010j

Suzuki, K., Bose, P., Leong-Quong, R. Y., Fujita, D. J., & Riabowol, K. (2010). REAP: A two minute cell fractionation method. *BMC research notes*, *3*(1), 294. doi:10.1186/1756-0500-3-294

Teng, A. C. T., Al-Montashiri, N. a M., Cheng, B. L. M., Lou, P., Ozmizrak, P., Chen, H.-H., & Stewart, A. F. R. (2011). Identification of a phosphorylation-dependent nuclear localization motif in interferon regulatory factor 2 binding protein 2. *PloS one*, *6*(8), e24100. doi:10.1371/journal.pone.0024100

Teng, M., Jiang, X., Zhang, Q., Zhang, J., Zhang, D., Liang, G., & Huang, Y. (2012). Microtubular stability affects pVHL-mediated regulation of HIF-1alpha via the p38/MAPK pathway in hypoxic cardiomyocytes. *PloS one*, *7*(4), e35017. doi:10.1371/journal.pone.0035017

Wang, Y. (1998). Cardiac Muscle Cell Hypertrophy and Apoptosis Induced by Distinct Members of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Family. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(4), 2161–2168. doi:10.1074/jbc.273.4.2161

Wang, Yibin. (2007). Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. *Circulation*, *116*(12), 1413–23. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679589

Wu, Y., & Anderson, M. E. (2014). CaMKII in sinoatrial node physiology and dysfunction. *Frontiers in pharmacology*, *5*(March), 48. doi:10.3389/fphar.2014.00048